T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE de NANCY I

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR - INGENIEUR

par

Daniel THOUVENOT

Sur l'intervention d'une enzyme phosphorylant l'acide glutamique dans la première étape de biosynthèse de la proline chez Saccharomyces cerevisiae.

Soutenue le 20 AVRIL 1971 devant la Commission d'examen

- M. R. GAY, Président,
- Mme H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, Examinateur
- MM. VILLOUTREIX, Examinateur
- L. CHAPON , Examinateur.

-:-:-:-:-

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551928_0013

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE de NANCY I

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR - INGENIEUR

par

Daniel THOUVENOT

Sur l'intervention d'une enzyme phosphorylant l'acide glutamique dans la première étape de biosynthèse de la proline chez Saccharomyces cerevisiae.

Soutenue le 20 AVRIL 1971 devant la Commission d'examen

- M. R. GAY, Président,
- Mme H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, Examinateur
- MM. VILLOUTREIX, Examinateur
- L. CHAPON , Examinateur.

-:-:-:-:-

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MA FILLE

AVANT PROPOS

Je suis heureux de remercier Monsieur le Professeur R. GAY, directeur de l'Ecole Supérieure de Brasserie, Malterie et Biochimie Appliquée de m'avoir vivement encouragé à préparer une thèse de Docteur Ingénieur sous la direction scientifique de Monsieur C. BOURGEOIS, Maître Assistant et Professeur de Microbiologie à l'Ecole Nationale Supérieure d' d'Agronomiq et des Industries Alimentaires.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur BOURGEOIS pour ses nombreux conseils et son assistance amicale. Son aide me fut particulièrement précieuse pour la réalisation et la rédaction de ce travail.

J'adresse également mes bien vifs remerciements à Madame SZULMAJSTER, Maître de Recherches au Centro National de la Recherche Scientifique, pour les suggestions constructives qu'elle m'a prodiguées au cours de l'élaboration et de la rédaction de ce travail.

Je remercie enfin d'avoir bien voulu examiner ce travail outre M. le Professeur GAY, Président du Jury, et Madame SZULMAJSTER, Messieurs les Professeurs CHAPON et VILLOUTREIX

I N T R O D U C T I O N

* * *

La levure présente un comportement particulier vis à vis de la proline ; en effet, elle n'est capable de la dégrader qu'en aérobiose. Ce phénomène, étudié par DUTEURTRE(1) présente un double aspect : perméasique et catabolique. L'oxygène moléculaire est nécessaire pour l'oxydation de la proline, catalysée par la proline oxydase; d'autre part, une perméase , spécifique de la proline, réprimée en présence des ions NH_4^+ ne peut être déréprimée qu'en aérobiose.

Les voies de biosynthèse et de dégradation de cet acide aminé semblent maintenant presque élucidées chez E. coli. Il n'en est pas de même chez S. cerevisiae et N. crassa. Chez ces microorganismes, très peu d'études se rapportent au métabolisme de la proline.

Dans le but d'étudier la biosynthèse de cet acide aminé chez S. cerevisiae, nous avons recherché des mutants auxotrophes pour la proline. Un mutant nécessitant la proline a été isolé. L'étude de son comportement nous a permis d'aborder le problème posé par la première étape de la biosynthèse de la proline. Cette première étape a fait l'objet d'études récentes chez E. coli (2, 3, 4) où elle est maintenant assez bien connue, ce qui n'est pas le cas chez les champignons.

Nous avons pu mettre en évidence la formation d'un composé phosphorylé, riche en énergie, jouant le rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse de la proline.

Les résultats que nous avons obtenus permettent de penser que la phosphorylation du glutamate est catalysée par deux enzymes, d'une part la glutamine synthétase qui participe à la biosynthèse de la glutamine et d'autre part la glutamokinase qui intervient dans la biosynthèse de la proline.

Notre travail a consisté essentiellement à essayer de montrer que ces deux enzymes sont distinctes. Nous avons recueilli de solides arguments en faveur de cette hypothèse ; toutefois, la séparation de la glutamokinase et de la glutamine synthétase n'a pas été réalisée.

en l'absence d'A T P. La vitesse de formation est la même en présence ou en l'absence de glutamine synthétase (7).

Le γ-glutamyl phosphate est un composé hautement réactif qui a pu être synthétisé : il réagit instantanément avec NH_4OH et donne de la glutamine ; avec NH_2OH, il donne du γ-glutamylhydroxamate et dans l'eau, il se cyclise spontanément pour former l'acide Δ1-pyrrolidone-5-carboxylique (8, 9).

Des études réalisées à l'aide de composés marqués ont contribué à l'élucidation du mécanisme. BOYER et coll.(10) trouvèrent qu'avec du glutamate marqué en γ à l'^{18}O, celui-ci se retrouvait dans le phosphate inorganique formé. De même VARIER et coll. (11) trouvèrent que dans la réaction inverse (réaction de transfert) l'^{18}O est transféré du phosphate inorganique au glutamate. Les réactions de synthèse et de transfert sont catalysées par la même enzyme (12).

Ces résultats sont compatibles avec la formation d'un dérivé phosphorylé en γ du glutamate ; des études à l'A T P^{32} et au ^{14}C glutamate ont montré qu'il se formait un γ-glutamyl phosphate lié à l'enzyme (13, 14).

3-Mise en évidence de la formation d'un groupement carboxyle activé.

MEISTER a mis en évidence la formation de γ-glutamyl-phosphate par chauffage du milieu réactionnel à 55°C ; le γ-glutamyl phosphate se libère de l'enzyme et se cyclise spontanément en acide Δ_1- pyrrolidone-5-carboxylique. La dénaturation thermique à 100°C provoque la libération d'acide glutamique, non d'acide Δ_1-pyrrolidone-5-carboxylique.

le schéma de biosynthèse de la glutamine proposé par MEISTER (12) rend compte de ces phénomènes.(Fig.1)

4-Stéréospécificité de la réaction

Selon MEISTER (12), la synthèse de la glutamine se ferait en 2 étapes de stéréospécificités différentes :

- la première, non stéréospécifique transformerait en γ-glutamyl phosphate les isomères D et L de l'acide glutamique

../..

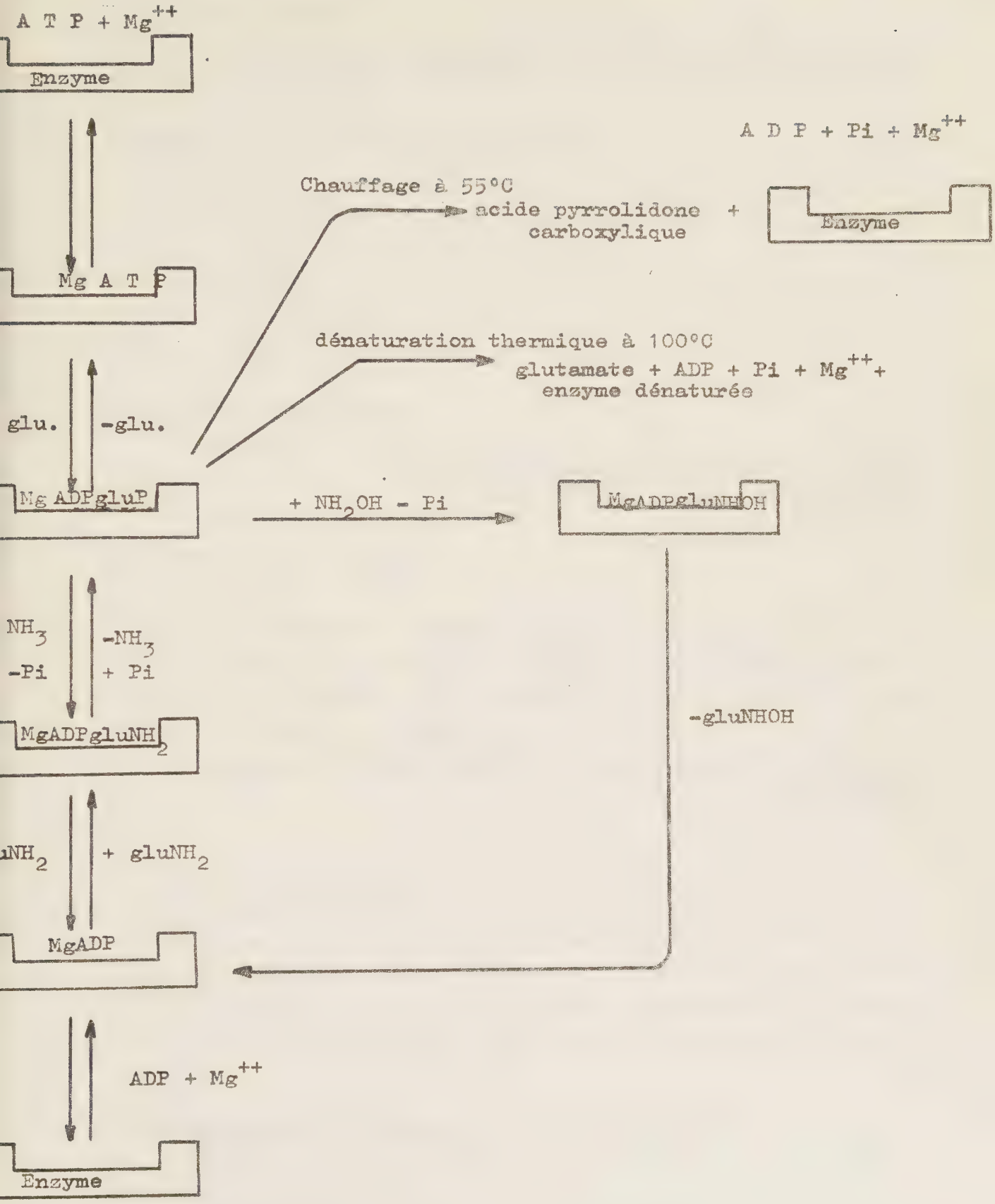


Figure 1 : Schéma de biosynthèse de la glutamine selon MEISTER (12).

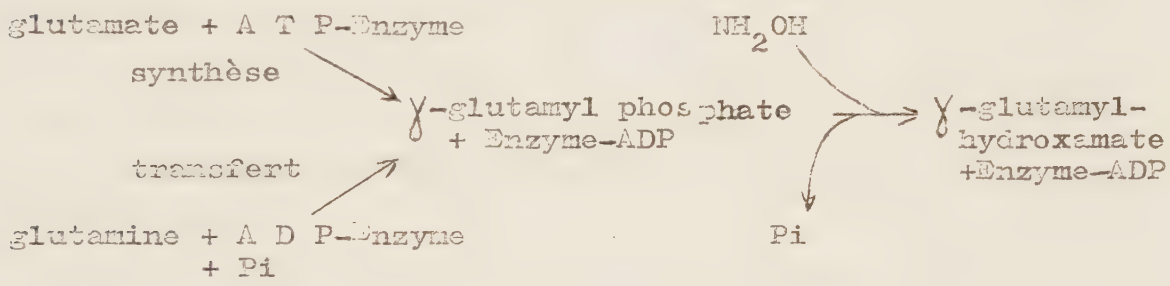
à la même vitesse.

- la deuxième étape , de fixation de NH_4^+ sur le résidu glutamyl serait spécifique du L-glutamate : il ne se forme que de la L-glutamine.

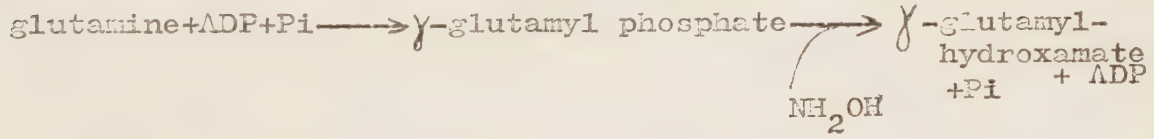
5-Dosage et purification de l'enzyme

Les méthodes de dosage employées sont identiques dans leur principe, qu'on mesure l'activité de synthèse de l'enzyme ou son activité de transfert (15).

On mesure la quantité de γ-glutamylhydroxamate formé à partir du γ-glutamyl phosphate, en utilisant le glutamate ou la glutamine comme substrats (25, 26).



STADTMAN, WOOLFOLK et SHAPIRO (16,17) ont purifié la glutamine synthétase de E.coli et étudié sa régulation. La purification de l'enzyme a été réalisée en tenant compte de l'activité de transfert uniquement :



L'activité de synthèse de cette enzyme est soumise à une rétro-inhibition cumulative par l'alanine, le glycocolle, l'histidine, le tryptophane, la glucosamine-6-phosphate, le carbamyl phosphate, le C T P et l'A M P. Aucune action de la proline n'a été relevée. Les ions NH_4^+ répriment la glutamine synthétase et ont un effet inactivant sur son activité de synthèse.

6-Glutamine synthétase de la levure S. cerevisiae

KOHLAW, DRAGERT et HOLZER (18), étudiant la répression parallèle de la glutamine synthétase et de la N A D glutamate déshydrogénase ont fait une étude sommaire de cette glutamine synthétase. Celle-ci ne semble pas différer sensiblement de celle de E.coli. La glutamine synthétase de la

levure est responsable des 2 activités : synthèse et transfert , comme chez E.coli, mais les agents de rétro-inhibition sont le G M P, le C T P et le N A D. Les ions NH_4^+ répriment partiellement la synthèse de cette enzyme $2\ 10^{-3}$ M de $(NH_4)_2SO_4$ donnent 80% de répression.

B - BIOSYNTHESE DE LA PROLINE-

1- Chez E. coli.

a) Mise en évidence de la voie.

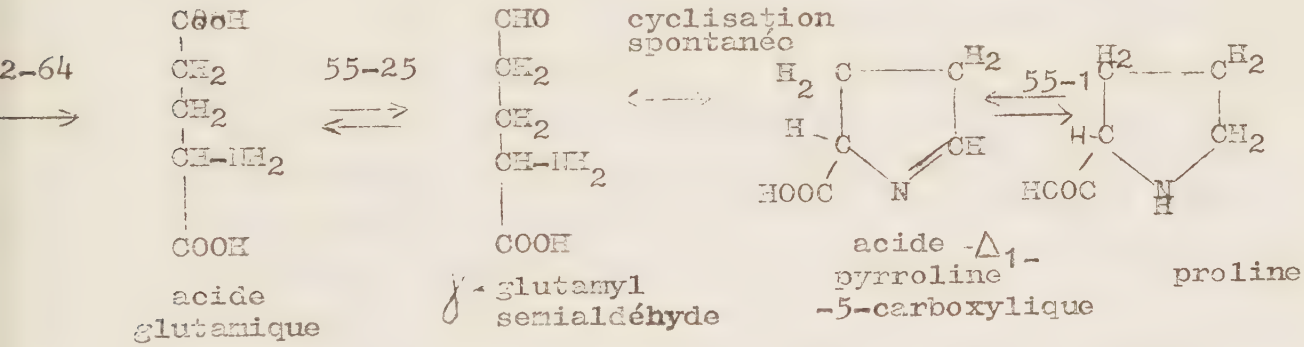
VOGEL et DAVIS (19) ont les premiers commencé à étudier la biosynthèse de la proline chez E.coli à l'aide de trois mutants auxotrophes pour cet acide aminé.

-Le mutant 22-64 exige pour sa croissance l'acide glutamique, l'acide glutamique-γ-semialdéhyde ou la proline.

-Le mutant 55-25 exige l'acide glutamique-γ-semialdéhyde ou la proline.

-Le mutant 55-1 exige la proline de façon stricte et accumule l'acide glutamique-γ-semialdéhyde.

Ces auteurs proposent la séquence suivante pour les réations de biosynthèse de la proline chez E.coli :



b)Etude de la première étape.

La première étape de cette voie a fait l'objet d'études récentes qui ont permis d'en élucider le mécanisme.

STRECKER (20), travaillant sur la souche 55-1 de E.coli qui accumule le γ-glutamyl semialdéhyde a étudié la formation de ce composé à partir de l'acide glutamique.

Il réalise la réaction sur des cellules entières en dosant

le composé formé par sa réaction avec l'o-aminobenzaldéhyde ajouté en fin de réaction. Les essais de dosage sur des extraits acellulaires ont échoué.

L'auteur met en évidence l'effet activateur du pyruvate, du lactate, de l'A M P, des ions Mg^{++}. La réaction se produit aussi bien avec le glutamate qu'avec la glutamine, en présence d'air.

Des essais de mise en évidence de la formation de γ-glutamyl phosphate, par l'hydroxylamine ont échoué. STRECKER en conclut qu'il ne se forme pas de γ-glutamyl phosphate et que la réduction de l'acide glutamique en son γ-semialdéhyde n'est certainement pas semblable à celle qu'on observe pour l'acide aspartique : BLACK et WRIGHT (21) ont mis en évidence le rôle intermédiaire du β-aspartyl phosphate dans la réduction de l'acide aspartique en β-aspartyl semialdéhyde.

α) Inhibition par la proline.

Le même auteur observe une inhibition de la réaction par la proline. Avec des cellules congelées, celle-ci ne se produit plus. Cet effet inhibiteur de la proline sur la réduction de l'acide glutamique en γ-glutamyl semialdéhyde a aussi été mis en évidence par TRISTRAM (22), travaillant également sur la souche 55-1 de E.coli.

BAICH et PIERSON (2) précisèrent l'effet de la proline sur la réduction de l'acide glutamique en γ-glutamyl semialdéhyde chez E.Coli. La proline agit à la fois par rétroinhibition et par répression de la synthèse de l'enzyme responsable de cette transformation.

L'A M P et le fructose-6-phosphate inhibent également l'enzyme mais à un site différent de celui de la proline (24)

β) Mise en évidence d'une glutamokinase.

Récemment, BAICH (3) mit en évidence le rôle d'intermédiaire du γ-glutamyl phosphate dans la biosynthèse de la proline, par sa réaction avec l'hydroxylamine. L'action de la glutamokinase responsable de cette réaction se différencie de celle de la glutamine synthétase par la rétroinhibition que la proline exerce sur elle, la méthode de dosage étant

identique pour les deux enzymes (3,4). Cette méthode n'est autre que celle mise au point par LIPPMAN et TUTTLE (27) pour les acyl phosphates.

BAICH pense que, comme pour la glutamine synthétase, le γ-glutamyl phosphate formé reste lié à l'enzyme, étant donné sa très haute réactivité.

Quant à la transformation du γ-glutamyl phosphate en γ-glutamyl semialdéhyde, aucune étude n'a encore été faite à ce sujet ; BAICH pense que cette réaction pourrait être catalysée par une enzyme liée à la glutamokinase ou proche d'elle, dans les cellules d'E. coli (3).

2-Chez les champignons.

VOGEL et BONNER (28) mirent en évidence l'existence de cette voie à l'aide de mutants de N. crassa, de même ABELSON et VOGEL (29) la découvrirent chez T. utilis.

L'existence de mutants de Neurospora répondant à l'ornithine, l'arginine, la proline ou le γ-glutamyl semialdéhyde compliqua le problème. Il était alors logique de penser que le γ-glutamyl semialdéhyde était un précurseur commun à l'ornithine et à la proline. La formation de proline à partir du Δ_1-pyrroline-5-carboxylate par une Δ_1-pyrroline-5-carboxylate réductase a, d'autre part, été démontrée chez N. crassa comme chez E. coli (30,31).

Mais DAVIS (32) a montré que de tels mutants, bloqués entre l'acide glutamique et le γ-glutamyl semialdéhyde, croissent pourtant sur $(NH_4)_2SO_4$ comme seule source d'azote avec un temps de génération et une phase de latence assez longs.

Chez S. cerevisiae, la biosynthèse de la proline n'a pas encore été étudiée, mais il est peu probable qu'elle diffère beaucoup de ce que l'on observe chez E. coli et N. crassa, pour lesquels le γ-glutamyl semialdéhyde est un intermédiaire.

C-BIOSYNTHESE DE L'ORNITHINE

1-Chez les bactéries. (Fig.2)

La biosynthèse de l'ornithine s'effectue par la voie dite des composés acétylés ; dans cette suite de réactions, le

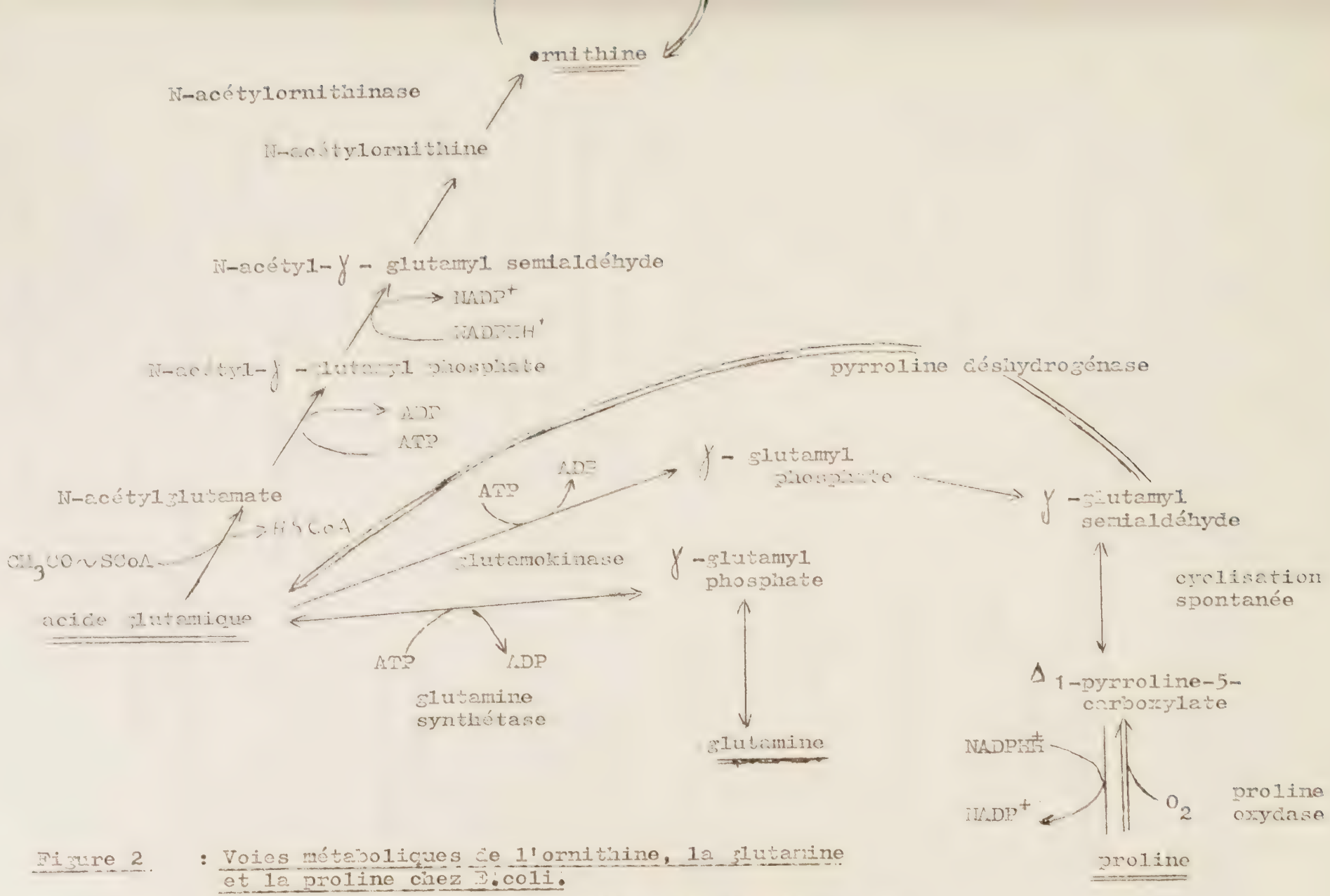
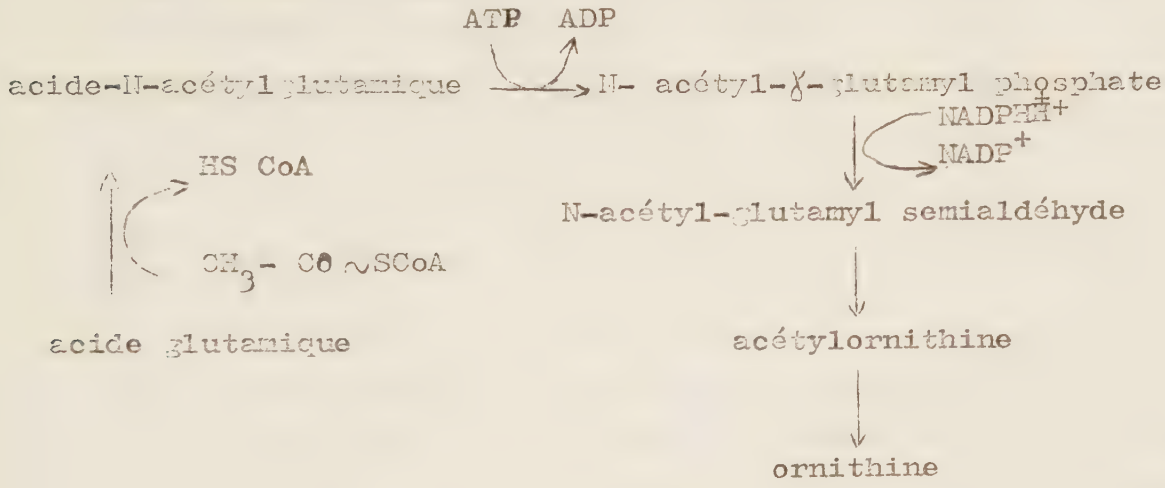


Figure 2 : Voies métaboliques de l'ornithine, la glutamine et la proline chez E.coli.

voies anaboliques ——→ voies cataboliques ⟹

groupement NH_2 de l'acide glutamique est acétylé, ce qui évite des cyclisations spontanées avec le groupement carbonyl distal des intermédiaires. Chez E. coli, la séquence des réactions est la suivante :



La réduction du N-acétylglutamate en N-acétyl-γ-glutamyl semi aldéhyde a fait l'objet d'études récentes de grand intérêt.

UDAKA et KINOSHITA (33) montrèrent sur des extraits de Micrococcus glutamicus que la réduction de l'acide N-acétyl-glutamique en N-acétyl-γ-glutamyl semialdéhyde se faisait avec la formation d'un intermédiaire phosphorylé sur le groupement carboxyle en position γ. La formation de ce N-acétyl-γ-glutamyl phosphate requiert de l'ATP, des ions Mg^{++}.

La réaction catalysée par la N-acétylglutamokinase est:

N-acétyl-L-glutamate + ATP ⟶ N-acétyl-γ-glutamyl phosphate + ADP.

Ce composé peut être mis en évidence par sa réaction avec l'hydroxylamine : il se forme de l'acide N-acétyl-γ-glutamylhydroxamique.

N-acétyl-L-glutamate+ATP+NH_2OH ⟶ N-acétyl-γ-glutamylhydroxamate + ADP + Pi

L'activité de cette enzyme est rétroinhibée par l'arginine (33,4).

Chez E. coli, il a été montré que le système de réduction du N-acétylglutamate en N-acétyl-γ-glutamyl semialdéhyde

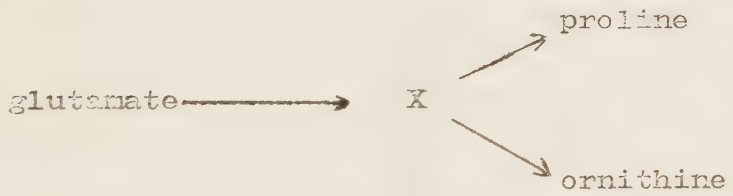
s'effectue en 2 étapes catalysées chacune par une enzyme spécifique (4).

Un système analogue a été mis en évidence aussi chez Chlamydomonas reinhardti (36).

2-Chez les champignons (Fig. 2bis)

Chez ces organismes, la voie de biosynthèse de l'ornithine ne fut pas aussi simple à mettre en évidence que chez les bactéries. En effet, plusieurs hypothèses contradictoires ont été émises.

Tout d'abord, l'existence de mutants de Neurospora et de Pénicillium répondant à la proline, l'ornithine, la citrulline ou l'arginine mais pas à l'acide glutamique faisait envisager l'existence d'un dérivé du glutamate comme précurseur commun à l'ornithine et à la proline suivant le schéma suivant: (37)



Or le γ-glutamyl semialdéhyde peut également servir de facteur de croissance à ce type de mutants (38). Ce composé est un précurseur de la proline chez E.coli (20) et FINCHAM (39) mit en évidence une transaminase le transformant en ornithine chez N. crassa.

Le composé X, commun aux deux voies de biosynthèse pouvait donc être le γ-glutamyl semialdéhyde. Mais la présence de l'ornithine transaminase chez un mutant strictement auxotrophe pour l'ornithine exclut une telle hypothèse.

VOGEL et BONNER (28) émirent l'hypothèse du "channelling": deux voies de biosynthèse parallèles canaliseraient la transformation du glutamate en γ-glutamyl semialdéhyde soit vers l'ornithine, soit vers la proline. Les deux "pools" de γ-glutamyl semialdéhyde seraient donc distincts dans les cellules.

../..

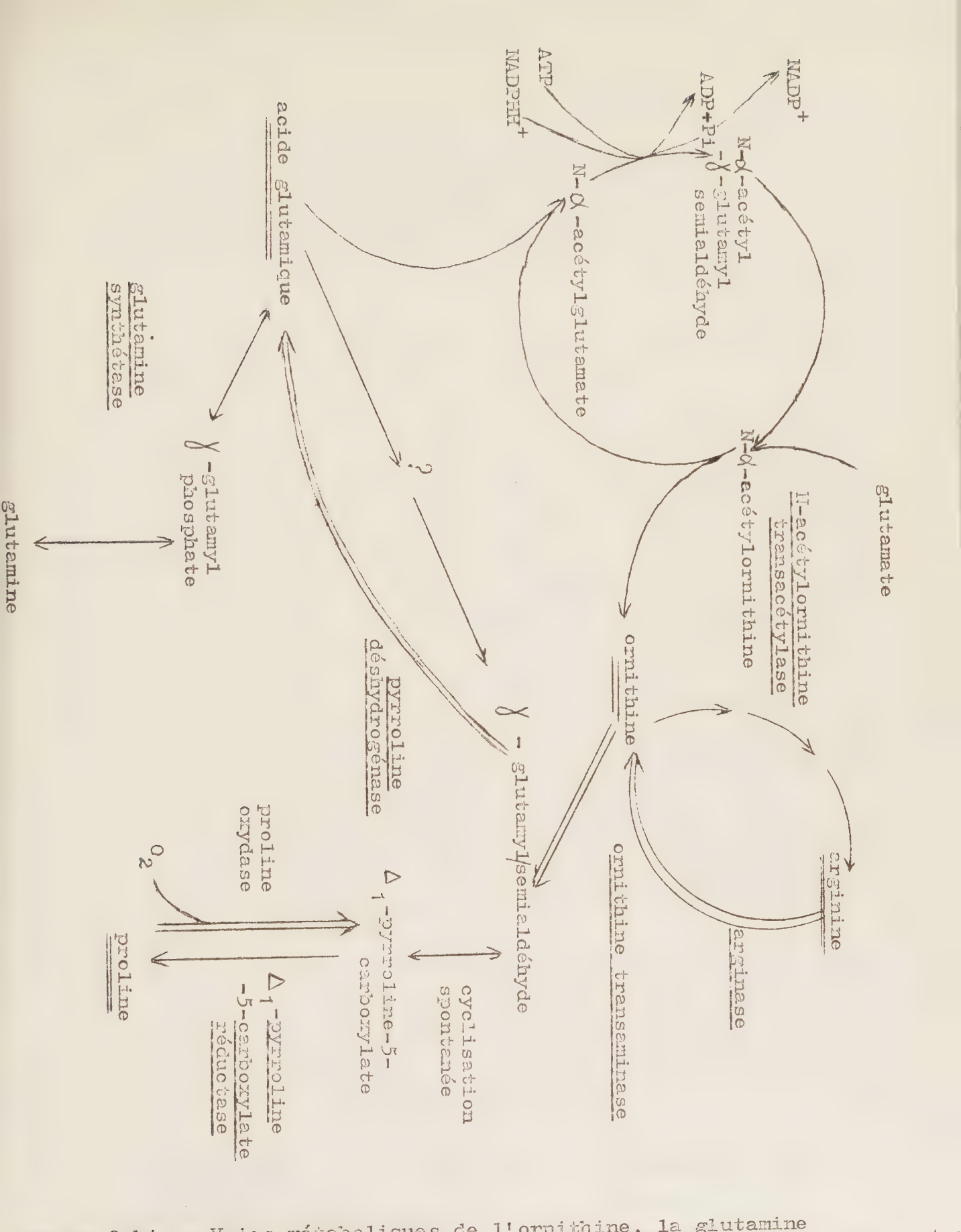


Figure 2 bis : Voies métaboliques de l'ornithine, la glutamine et la proline chez les champignons- (d'après De DECKEN : (6

voies anaboliques ⟶ voies cataboliques ⟹

glutamate ⟶ γ-glutamyl semialdéhyde ⟶ ornithine

glutamate ⟶ γ-glutamyl semialdéhyde ⟶ proline

Cette hypothèse ne rend pas compte de l'existence de mutants répondant à l'ornithine ou à la proline.

Pourtant, il ne semblait pas qu'une voie des composés acétylés puisse exister chez les champignons, comme chez les bactéries, car on ne pouvait y mettre en évidence une N-acétylornithinase (28) ni isoler de mutants auxotrophes pour la N-acétylornithine (38).

Mais De DECKEN (23) mit en évidence chez S. cerevisiae la réduction du N-acétylglutamate en N-acétyl-γ-glutamyl semialdéhyde en présence d'ATP et de $NADPHH^+$, ainsi que la répression et la rétroinhibition de cette étape par la L- arginine. Ce même auteur montra aussi l'existence d'une enzyme transférant le groupement acétyl de la N-acétylornithine sur le glutamate (6) ; cette enzyme est absente chez le mutant $arg._7$, auxotrophe pour l'arginine.

Ces résultats prouvent que la biosynthèse de l'ornithine chez la levure se fait par la voie des composés acétylés et que la dernière étape de cette voie est une transacétylation.

C'est d'ailleurs dans le mécanisme de cette dernière étape que réside la différence essentielle avec ce que l'on observe chez les bactéries ; chez ces organismes, au lieu d'une transacétylation qui recycle l'acétylglutamate on a une hydrolyse qui libère de l'acétate

<u>champignons</u>

N-acétylornithine ⟶ ornithine

N-acétylornithine + glutamate ⟶ acétylglutamate

<u>bactéries</u>

N-acétyl ornithine ⟶ ornithine

N-acétyl ornithine ⟶ CH_3COOH

../..

D-INTERRELATIONS ENTRE LES VOIES METABOLIQUES DE L'ORNITHINE ET DE LA PROLINE

Chez la plupart des microorganismes, les voies métaboliques de l'ornithine et de la proline sont étroitement mêlées mais différentes.

La proline est transformée en Δ_1-pyrroline-5-carboxylate par la proline oxydase ; cette transformation exige l'oxygène moléculaire chez la plupart des organismes aérobies y compris S. cerevisiae (1).

L'ornithine est transformée en γ-glutamyl semialdéhyde par une ornithine transaminase. Il semble que cette enzyme ait uniquement un rôle catabolique et ne puisse servir à fournir une source d'ornithine à partir de la proline (39) puisque des mutants auxotrophes pour l'ornithine ne peuvent en faire la synthèse à partir de la proline. Le γ-glutamyl semi-aldéhyde est ensuite transformé en glutamate par une déshydrogénase.

1 - Cas des bactéries

DE HAUVER, LAVALLE et WIAME (40) ont montré que chez B. subtilis il existe 2 pyrroline déshydrogénases différentes transformant le Δ^1-pyroline-5-carboxylate en glutamate, l'une induite par l'arginine, l'autre par la proline.

LAISHLEY et BERNLOHR (41) découvrèrent les mêmes séquences de réactions mais aussi l'induction du catabolisme de la proline par l'arginine et réciproquement.

Chez les Clostridia, la transformation d'ornithine en proline est entièrement oxydative, il n'y a pas d'ornithine transaminase (42).

Chez E. coli, les interconversions d'ornithine en proline sont également possibles ; mais chez cet organisme, comme chez toutes les bactéries Gram$^-$, l'ornithine transaminase n'a qu'une très faible activité (43). Ceci explique que la mutant 55-25 de E. coli, incapable de synthétiser le γ-glutamyl semialdéhyde à partir du glutamate ne réponde pas à l'ornithine. Cependant REED et LUKENS (44) ont

réussi à transformer le ^{14}C. N-acétylglutamate en ^{14}C. proline, grâce à une très faible activité ornithine transaminase. Cette voie ne semble pas avoir de rôle physiologique.

Chez le mutant 55-25, la conversion du ^{14}C glutamate en ^{14}C.proline ne se fait pas et celle du ^{14}C glutamate en ^{14}C.arginine est réduite. De même chez un auxotrophe pour l'arginine, la conversion du ^{14}C.glutamate en ^{14}C.proline est faible. On observe d'ailleurs les mêmes phénomènes chez la souche sauvage cultivée soit sur arginine, soit sur proline.

Ces faits suggèrent que l'indépendance des deux voies n'est pas totale.

2-Chez les champignons. (Fig.3)

L'obtention de mutants auxotrophes de Neurospora arg_8. et arg_9. répondant à la proline, l'arginine ou l'ornithine mais poussant sur $(NH_4)_2SO_4$ après une phase de latence et un temps de génération assez longs , faisait envisager des interconversions de l'ornithine en proline, par l'ornithine transaminase. DAVIS et MORA (45, 32) ont montré que les mutations arg_8 et arg_9. produisaient un "block" génétique dans la voie de la biosynthèse de la proline. Ils introduisirent dans le génôme de la souche arg_8. la mutation ota. entraînant l'absence d'activité ornithine transaminase. Les mutants ota. sont prototrophes, cette enzyme a donc uniquement un rôle catabolique.

Le mutant arg_8.ota. ainsi obtenu exige alors la proline de façon stricte et la croissance sur milieu minimum est supprimée.

Des mutants révertants de ces souches ont été analysés. La mutation arg_{12}^s qui entraîne une diminution de l'activité ornithine transcarbamylase, rend prototrophes les mutants arg_8. et arg_9. mais pas le mutant arg_8.ota.: la mutation arg_{12}^s. provoque une accumulation d'ornithine, utilisée pour la biosynthèse de la proline.

ANDERSON et EHRENSVARD (46) ont observé que chez un mutant pro. de N. crassa, déficient dans la dernière étape de biosynthèse de la proline, celle-ci pouvait être encore synthétisée en faible quantité à partir de l'arginine par une 3ème

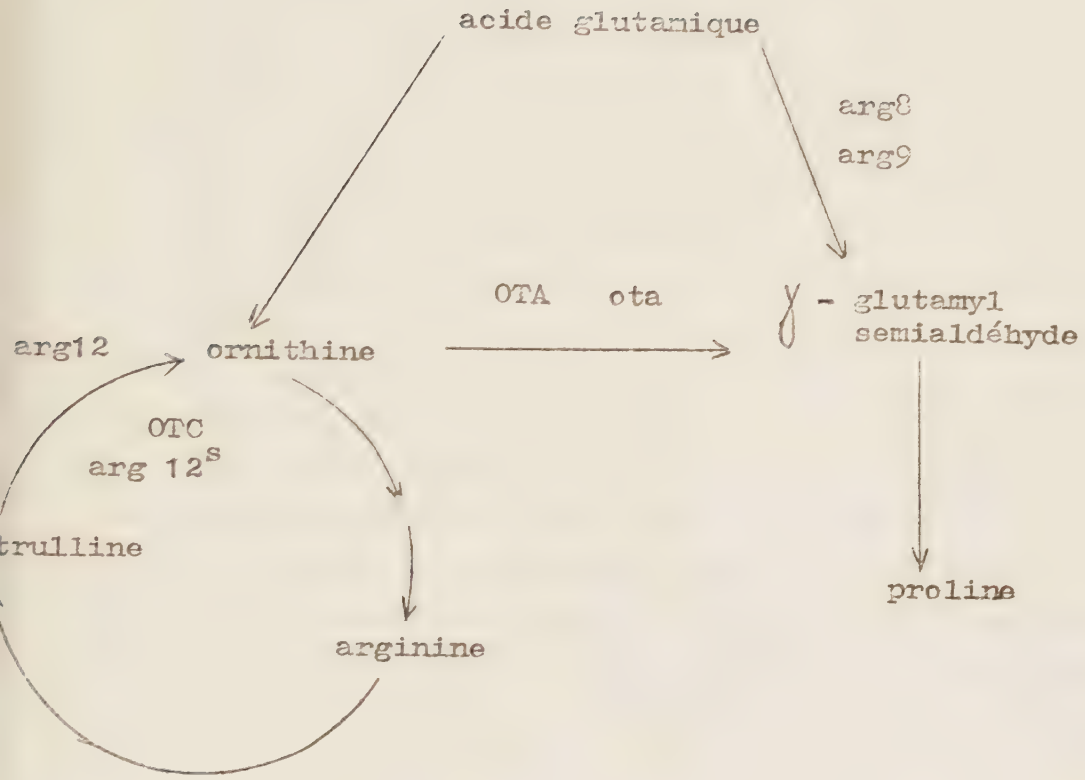


Figure 3 : Interrelations entre les voies métaboliques de l'ornithine et la proline chez N. crassa

OTA : ornithine transaminase

OTC : ornithine transcarbamylase

voie de biosynthèse qui serait :

Ornithine exogène ⟶ Δ_1-pyrroline -2-carboxylate ⟶ proline

Des études faites sur Aspergillus nidulans (58) tendraient également à suggérer la possibilité d'une troisième voie de biosynthèse de la proline. Cette voie, non fonctionnelle dans les souches sauvages, le deviendrait chez certains mutants pro. Le seul argument en faveur d'une telle hypothèse est l'existence de gênes proline "suppresseurs" (il s'agit en fait de suppresseurs physiologiques) non liés aux gênes pro. connus et qui rendent prototrophe une souche pro.ota, dont les deux voies de biosynthèse de la proline sont bloquées.

Chez ce microorganisme, trois groupes de gênes "suppresseurs" pour la proline ont été mis en évidence. Le premier groupe de 5 gênes rend l'ornithine transaminase et l'arginase constitutives; un autre gêne "suppresseur" réduit l'activité de l'ornithine transcarbamylase, responsable de la transformation ornithine ⟶ citrulline. Cette mutation, semblable à $arg_{12}s$ de N. crassa provoque une accumulation d'ornithine, qui est alors déviée vers la biosynthèse de la proline. Le 3e type de "suppresseur" ferait apparaître une 3e voie de biosynthèse de la proline.

En résumé, il semble que chez les champignons, 2 voies de biosynthèse de la proline soient possibles :

- la voie principale passant par la réduction du glutamate,
- une voie secondaire passant par l'ornithine, transformée par l'ornithine transaminase.

Cependant, aucune de ces 2 voies n'a été mise en évidence chez S. cerevisiae, bien que l'on ait connaissance de l'existence d'une ornithine transaminase.

Chez les bactéries, les interconversions d'ornithine en proline semblent jouer un rôle plus réduit.

II - MATERIEL ET METHODES

1 - Milieux

Les milieux 1 et 2 utilisés dérivent du milieu de base de Wickerham (47) pour l'étude de l'assimilation de l'azote chez les levures.

- Le milieu 1, peu concentré, sert aux études de croissance.
- Le milieu 2, plus concentré, est employé dans les cultures utilisées pour la préparation d'extraits enzymatiques
- Le milieu YEP est un milieu riche utilisé comme milieu de préculture, de conservation des souches et comme milieu complet dans certaines manipulations de sélection de mutants.

a) Milieu 1

Par litre : oligoéléments, vitamines, $MgSO_4$, $Cacl_2$, Nacl, comme dans le milieu de Wickerham, KH_2PO_4 5g, glucose 10g.
source azotée : soit $(NH_4)_2SO_4$ 10^{-3}M.
soit $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4}M + acide aminé en quantité telle que l'on ait toujours 2 méq. d'azote/l
pH final 5,0.

Dans ces conditions, la source azotée est limitante. Ce milieu peut être employé gélosé à 2%.

b) Milieu 2

par litre : base de Wickerham dose double, KH_2PO_4 13,610g, glucose 45g
source azotée : soit $(NH_4)_2SO_4$. 10^{-2} M
soit $(NH_4)_2SO_4$. 5.10^{-3}M + acide aminé en quantité telle que l'on ait toujours 20 meq. d'azote/l
soit proline 2.10^{-2}M.
pH final : 4,5.

La stérilisation de ces milieux s'effectue sur membrane Millipore GS 0,22 µ au moment de la répartition dans les fioles de culture.

c)Milieu YEP (48)

par litre : glucose 20g, trypticase (BD Mérieux) 20g, extrait de levure 10g.
Ce milieu peut également être employé gélosé à 2%. Il est stérilisé à 100°C, 2 fois 1 h, à 24 h. d'intervalle.

d) Milieu de sporulation.

C'est le milieu de FOWELL (49) dont la composition est par litre :
KCl 10g, acétate de sodium anhydre 5g, gélose 20g.
Ce milieu est stérilisé 20 mn à 120°C.

2 - Souches utilisées.

Nous avons utilisé la souche haploïde de S.cerevisiae 264-2-B de signe a, provenant de la collection de M. LUZZATI. Des souches auxotrophes vis-à-vis de différents acides aminés, et d'autres mutants ont été isolés par les méthodes décrites ci-dessous.
Parmi ces souches quelques unes ont été utilisées pour les travaux ultérieurs : une proline⁻, répertoriée 01-21 dans notre collection, et une ornithine transaminase⁻ : ota.17.

3 - Contrôle des croissances.

Pour les études de croissance, on utilise les fioles à diverticule de WEMB et STORCK (50), contenant 20ml de milieu 1. Ces fioles sont agitées sur un plateau oscillant (50 oscillations/mn).

Les croissances sont suivies par turbidimétrie à l'aide d'un photocolorimètre Beckman modèle C, à 660 nm. Les absorptions lues sont converties en matière sèche (µg/ml) grâce à une courbe d'étalonnage.

Les cultures destinées à la préparation des extraits enzymatiques sont obtenues sur milieu 2 dans un fermenteur de 4 l. New Brunswick modèle F.05.B avec agitation (136 tr./mn) et aération. La croissance est alors suivie par turbidimétrie sur des prélèvements dilués.

Les cultures ont lieu à 28°C. et l' aération n'est pas limitante.

../..

B - ISOLEMENT DE MUTANTS.

La technique utilisée est celle de SNOW (48), améliorée et mise au point pour nos besoins et notre souche (51).

Le principe de cette sélection repose sur le fait que la nystatine, antibiotique antifongique tue les cellules en développement alors qu'elle épargne celles qui ne se divisent pas.

Le principe général de la méthode est donné dans le schéma suivant : (Fig.4). La méthode de SNOW comporte plusieurs phases qui ont été réalisées sans les conditions suivantes :

1-Mutagénèse.

Les cellules , recueillies en phase stationnaire et mises en suspension dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 à la concentration de 10^7 cellules / ml., sont soumises à l'action mutagène de l'éthylméthane-sulfonate (EMS) à 1% pendant 3 h. à 28°C. sous agitation. Dans ces conditions, la léthalité est de 50% environ.

L'action du mutagène est arrêtée de la façon suivante : après filtration de la suspension, les cellules recueillies sont lavées par une solution de NaCl 0,9 %, puis mises en contact 10mn. avec une solution d'hyposulfite de sodium à 6%, enfin lavées à nouveau à l'eau salée.

2 - Expression des mutations.

Les cellules lavées sont remises en suspension dans un milieu complet de façon à permettre l'expression des mutations

3-Sélection des mutants.

Les cellules,prélevées en phase exponentielle, sont, après lavage, soumises à une privation d'azote suivie d'une mise en culture sur un milieu bien choisi : c'est au cours de la croissance sur ce milieu que sera exercée l'action sélective de l'antibiotique.

La source azotée doit permettre la multiplication du type sauvage et au cas où un type particulier de mutant est

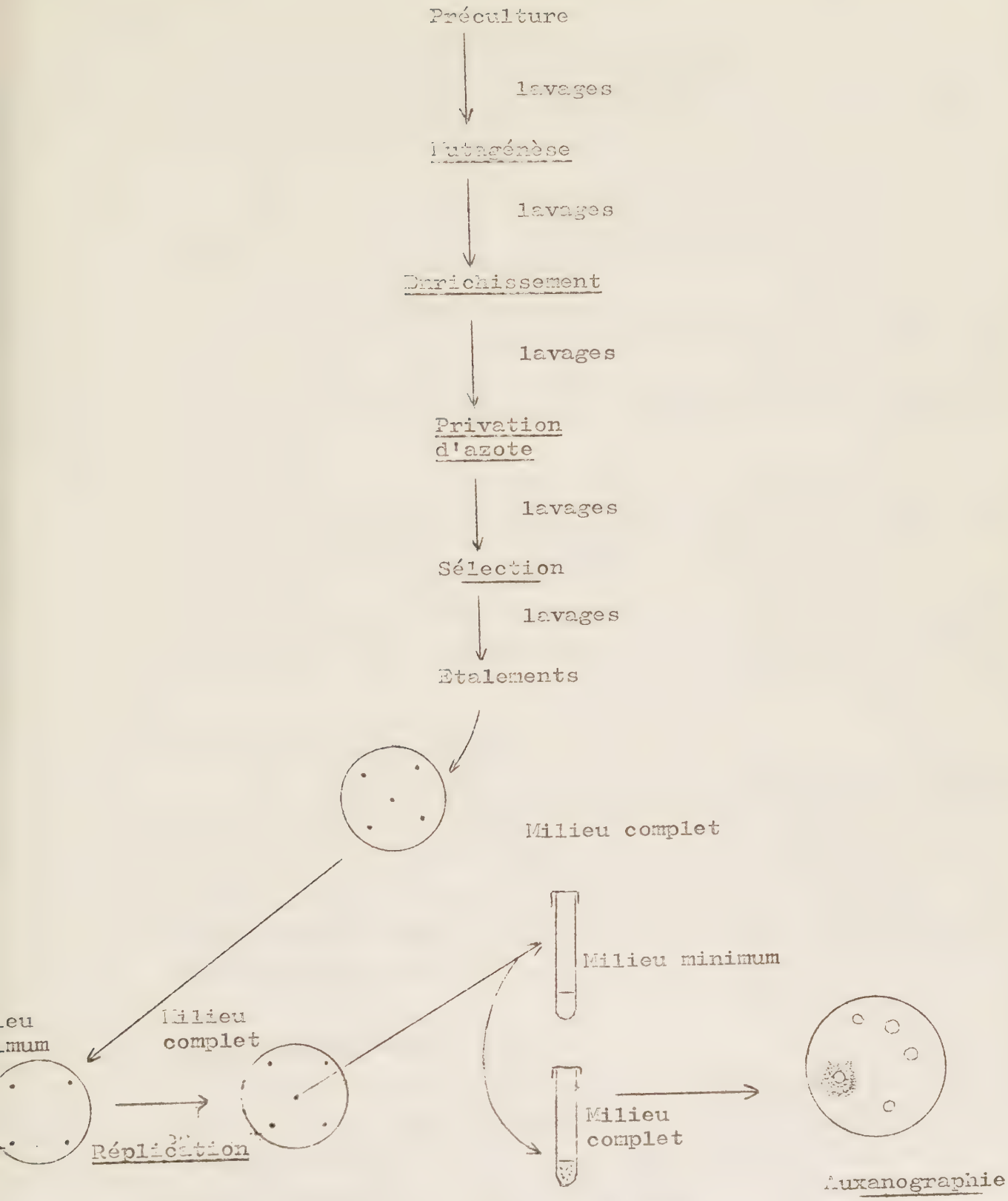


Figure 4 : Schéma de principe de la méthode d'obtention de mutants auxotrophes.

est désiré, elle doit permettre la croissance de tous les mutants indésirables, en laissant dans une inactivité protectrice les mutants recherchés.

Si le but poursuivi est la recherche de tous les mutants auxotrophes en général, le milieu de sélection contient $(NH_4)_2SO_4$ comme seule source d'azote.

Pour rechercher spécifiquement un mutant auxotrophe pour la proline, le milieu utilisé contenait tous les acides aminés sauf la proline. Ces acides sont employés à la concentration de 10 mg./l. sauf la L-cystine 50 mg./l. et la L-thréonine 20 mg./l.

Enfin, pour produire des mutants déficients quant à l'ornithine transaminase et l'arginase, un milieu contenant l'arginine comme seule source d'azote a été utilisé.

Plusieurs sélections peuvent être effectuées pour isoler des mutants dont l'apparition est moins fréquente : 2 sélections successives ont permis d'isoler le mutant proline⁻01-21.

4 - Isolement des mutants.

Il s'effectue par la méthode de réplication de LEDERBERG (52). Les souches présumées mutantes après réplication sont alors repiquées successivement sur milieu liquide minimum et sur milieu liquide complet, de façon à contrôler le caractère auxotrophe des souches isolées et à éliminer les souches instables.

5 - Caractérisation.

Elle s'effectue par une méthode auxanographique ; environ 5.10^7 cellules sont dispersées dans 10 ml. de milieu gélosé minimum refroidi à 45°C, coulé ensuite en boîte de Pétri. Après séchage de la gélose, des disques imbibés d'acides aminés sont déposés à sa surface de façon à caractériser les auxotrophies.

../..

6 - Optimisation de la méthode.

La croissance cellulaire est pratiquement arrêtée après 20 h. de jeune azoté. Une durée de 24 h. a été choisie pour les essais.

La nystatine est employée à raison de 150 U / ml. pendant 1 h., dans un milieu tamponné à pH 4,2 par KH_2PO_4 M/15 ; l'ensemencement est de 5.10^6 cellules / ml. La nystatine est ajoutée lorsque la population atteint 10^7 cellules / ml., c'est-à-dire quand la culture est en phase exponentielle.

C - OBTENTION D'UNE SOUCHE ISOGENIQUE DE SIGNE OPPOSE.

Pour effectuer des hydridations, il nous fallait une souche de signe opposé à celle que nous utilisons habituellement. Nous avons essayé d'obtenir une souche ayant exactement le même patrimoine génétique que celle de départ, mis à part le signe, en lui faisant subir une mutagénèse. Nous avons utilisé la technique décrite par HAWTHORNE (53).

1 - Préculture.

Les 2 souches à croiser, de même signe a, et dérivant de la souche 264-2-B sont cultivées séparément sur extrait de malt 16 % pendant 48 h à 28°C.

2 - Mutagénèse.

Les cellules des 2 cultures sont recueillies puis lavées et mélangées à raison de 5.10^6 cellules / ml. pour chacune des 2 souches, dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 pour subir le traitement mutagène décrit ci-dessus.

La mutagénèse doit permettre l'apparition de cellules du type α dans les 2 populations de type a. (54).

3 - Hybridation.

Pour favoriser la conjugaison des souches complémentaires, les cellules lavées sont remises en suspension dans 5 ml. d'extrait de malt et soumises à une agitation violente pendant 2 h à 22°C.

../..

La suspension est ensuite centrifugée 3 mn à 3000 g et le culot abandonné 30 mn à température ambiante. Cette phase favorise la conjugaison par un contact intime entre les cellules.

Après décantation, les cellules sont remises en suspension dans 5 ml d'extrait de malt frais et soumises pendant 3 h à 22°C à une agitation lente permettant toutefois une bonne aération.

La fusion des 2 types complémentaires de cellules donne naissance à des zygotes.

Si l'on confronte ainsi 2 souches déficientes pour un caractère nutritionnel différent, les zygotes obtenus seront prototrophes et pousseront sur milieu minimum, contrairement aux 2 souches parentales haploïdes.

4 - Isolement des spores.

Les souches diploïdes obtenues sont cultivées sur milieu YEP 48 h à 28°C. Les cellules lavées sont mises à sporuler sur milieu de FOWELL (49) 5 jours à 25°C.

Les asques sont remis en suspension dans 5 ml d'eau physiologique de façon à avoir 50.10^6 C/ml environ. On ajoute alors 0,05 ml de suc digestif d'escargot (l'industrie biologique française) à 100 000 U/ml de glycuronidase et on laisse agir 24 h. Dans ces conditions la paroi des asques est dissoute.

Les spores sont ensuite séparées par une action mécanique : 5 ml de suspension cellulaire sont agités pendant 15 s avec 10 g de billes de verre de diamètre 0,11 mm dans le broyeur Braun MSK tournant à faible vitesse (2000 t/mn).

Après ce traitement, on étale 0,2 ml de la suspension diluée 10^4 fois à la surface d'un milieu riche (YEP gélosé par exemple). Les colonies apparues après 3 jours à 28°C sont alors testées pour leur signe (confrontation avec 2 souches a et α). On étale séparément sur milieu de sporulation des suspensions de la souche à tester et des mélanges de cette souche avec les testeurs a et α. Les

souches haploïdes sont ensuite testées en milieu liquide pour leurs besoins nutritionnels.

- PREPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES ET DOSAGE DES PROTEINES

1) Préparation des extraits enzymatiques

Les cellules cultivées sur milieu 2 sont lavées dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 et remises en suspension dans le même tampon additionné de : EDTA 10^{-3}M et glycérol 25 vol % (55). La densité cellulaire est ajustée entre 10 et 50 mg/ml de matière sèche.

La cellule de broyage contenant 20 g de billes de verre de diamètre 0,45-0,5 mm pour 10 ml de suspension cellulaire est placée dans un broyeur Braun MSX refroidi à la neige carbonique. Le traitement est de deux fois 1 mn à 4000 t/mn.

Les billes et les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 15 mn à 16 000g, à froid.

2) Filtration des extraits

Les extraits enzymatiques destinés aux essais de rétroinhibition par la proline ou au traitement de dénaturation thermique sont débarrassés de leurs petites molécules (acides aminés notamment) par passage sur un gel de Sephadex.

3 ml d'extrait brut sont passés sur une colonne de gel G-25 fine (20x1,4cm) , maintenue à 0°C et équilibrée par le tampon dans lequel s'effectue le broyage ; l'élution est assurée par le même tampon. Les protéines de l'extrait sont recueillies de 11 ml à 16 ml de volume d'élution. Le liquide sortant de la colonne est alors limpide et ne contient pas d'acides aminés (réaction à la ninhydrine négative).

3) Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode du biuret (56), la sérumalbumine bovine Fluka est utilisée comme standard.

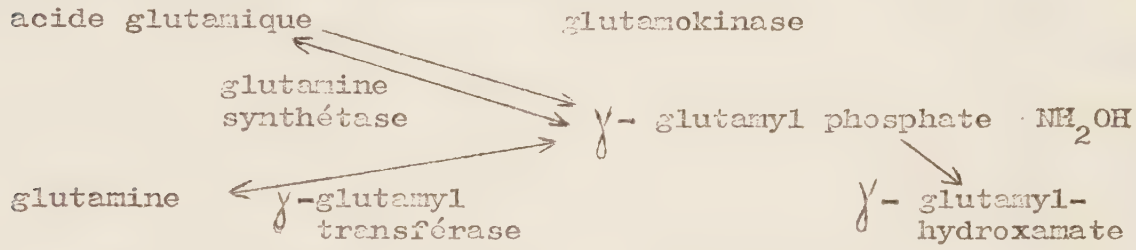
La présence de glycérol dans le tampon servant à la

préparation des extraits enzymatiques diminue la sensibilité de la méthode (57) et il a été nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage correspondant à chaque prise d'essai utilisée, c'est-à-dire à chaque concentration en glycérol (Fig.5)

E -DOSAGE DU γ-GLUTAMYL PHOSPHATE : MESURE de l'ACTIVITE des ENZYMES PHOSPHORYLANT le GLUTAMATE :

1) Formation du γ-glutamyl phosphate

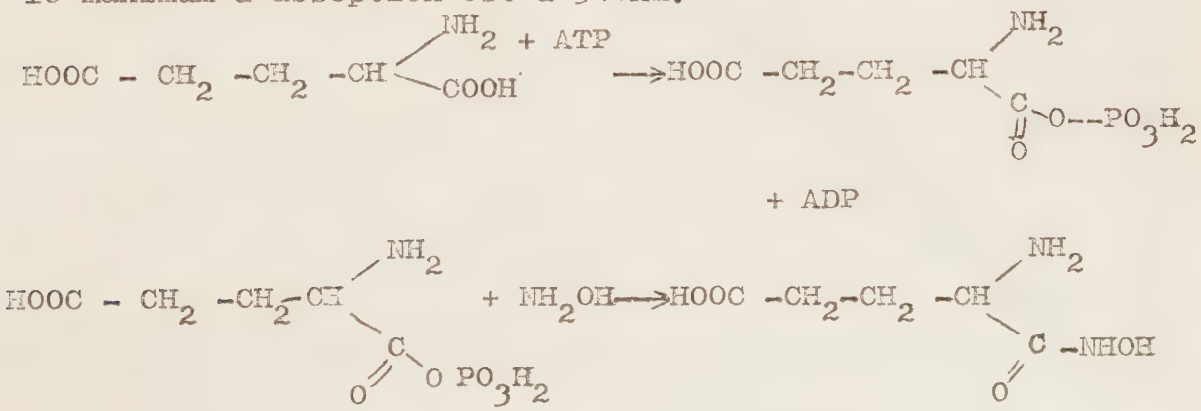
Le γ-glutamyl phosphate se forme à partir de l'acide glutamique ou de la glutamine



Sa biosynthèse à partir de l'acide glutamique est catalysée par la glutamine synthétase (activité de synthèse) et la glutamokinase ; à partir de la glutamine cette biosynthèse est catalysée par la γ-glutamyl transférase (activité de transfert de la glutamine synthétase).

2) Mise en évidence du γ-glutamyl phosphate et principe du dosage

Ce composé, lié à l'enzyme, se comporte comme tous les autres acyl phosphates, il réagit avec NH_2OH pour former l'acide γ-glutamyl-hydroxamique. Ce dernier se complexe avec les ions Fe^{+++} en donnant une coloration rouge brune dont le maximum d'absoption est à 540nm.



../..

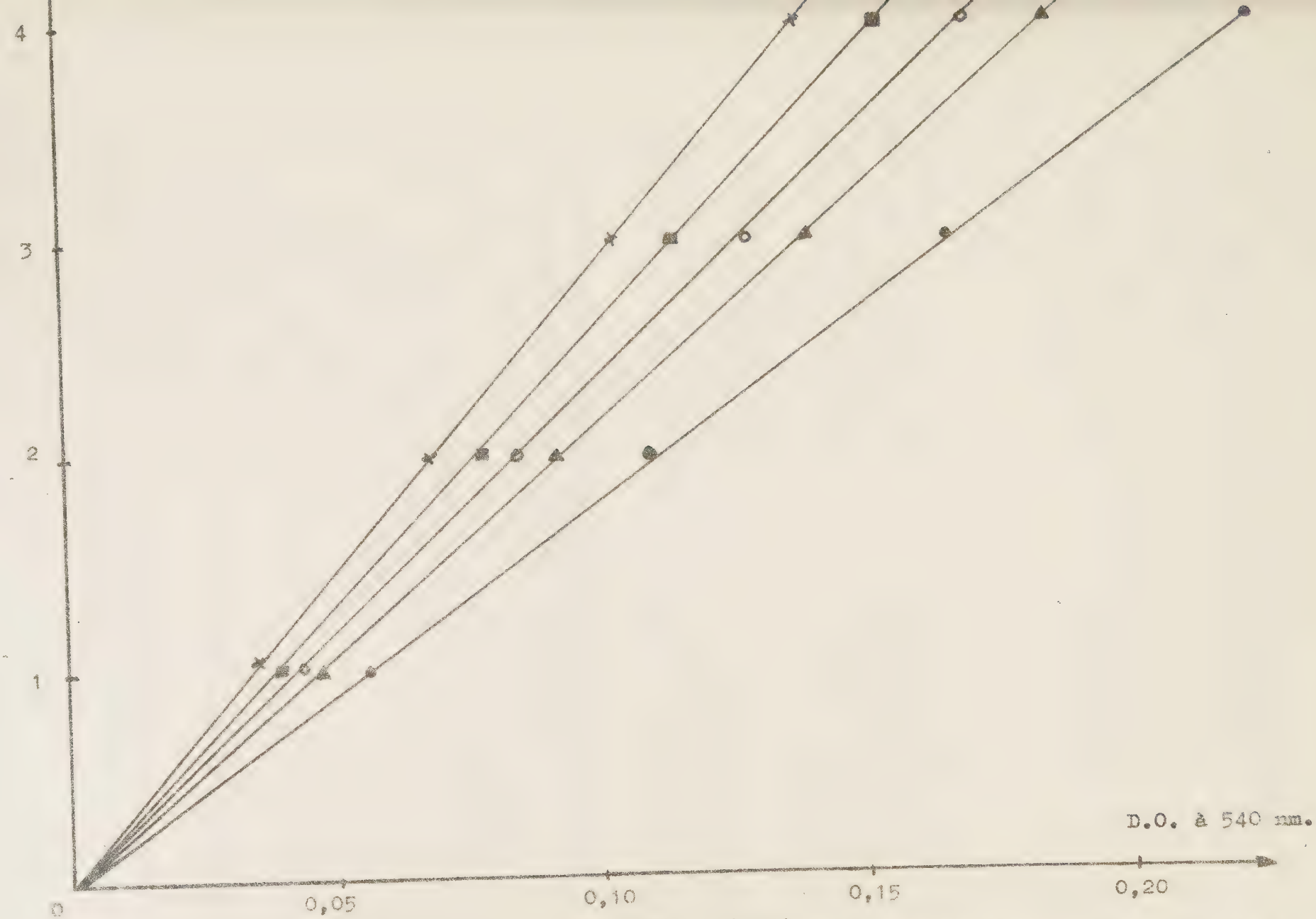
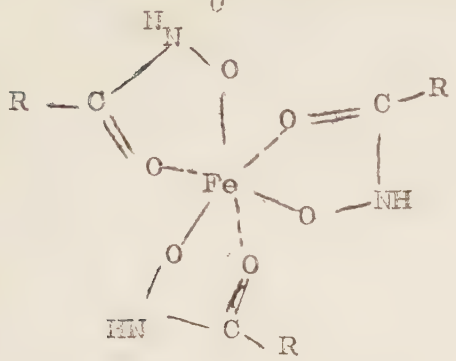


Figure 5 : Dosage des protéines par la méthode du biuret.
ml. de tampon au glycérol dans l'essai : —●— 0; —▲— 0,2 ; —○— 0,5; —■— 1 ; —✕— 2 .

On attribue la formule suivante au composé formé entre l'acide γ-glutamylhydroxamique et les ions Fe^{+++}



R = $HOOC-CH_2-CH_2-CH_2-$

La méthode de dosage est celle des acyl phosphates, mise au point par LIPMANN et TUTTLE (27). Le dosage à partir de l'acide glutamique comme substrat donne la somme des activités glutamokinase et glutamine synthétase (3.4)

3) Courbe d'étalonnage (Fig.6)

Elle a été réalisée à partir d'une gamme de concentrations de 0,5 à 5 µM de γ-glutamylhydroxamate dommercial. (Sigma), dans 4 ml de : réactif ferrique (2 ml) et eau (2 ml)

4) Dosage du γ-glutamyl phosphate formé à partir de l'acide glutamique : Choix des conditions opératoires

Tous les essais enzymatiques ont été effectués en tampon Tris - HCl 0,1 M pH 7,2 à la température de 30°C

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 2 ml de réactif ferrique contenant pour 600 ml :

- $FeCl_3$ solution à 28 % : 35 ml
- acide trichloracétique : 24 g
- HCl concentré : 50 ml

Le réactif est conservé à 4°C dans une bouteille brune à l'abri de la lumière.

La solution d'hydroxylamine est préparée et neutralisée juste avant l'emploi.

Les concentrations en substrats que nous avons choisies au départ sont celles de YOSHINAGA (4) :

Glutamate	:	100 µM/ml
ATP	:	20 µM/ml
Mg^{++}	:	20 µM/ml
NH_2OH	:	400 µM/ml

../..

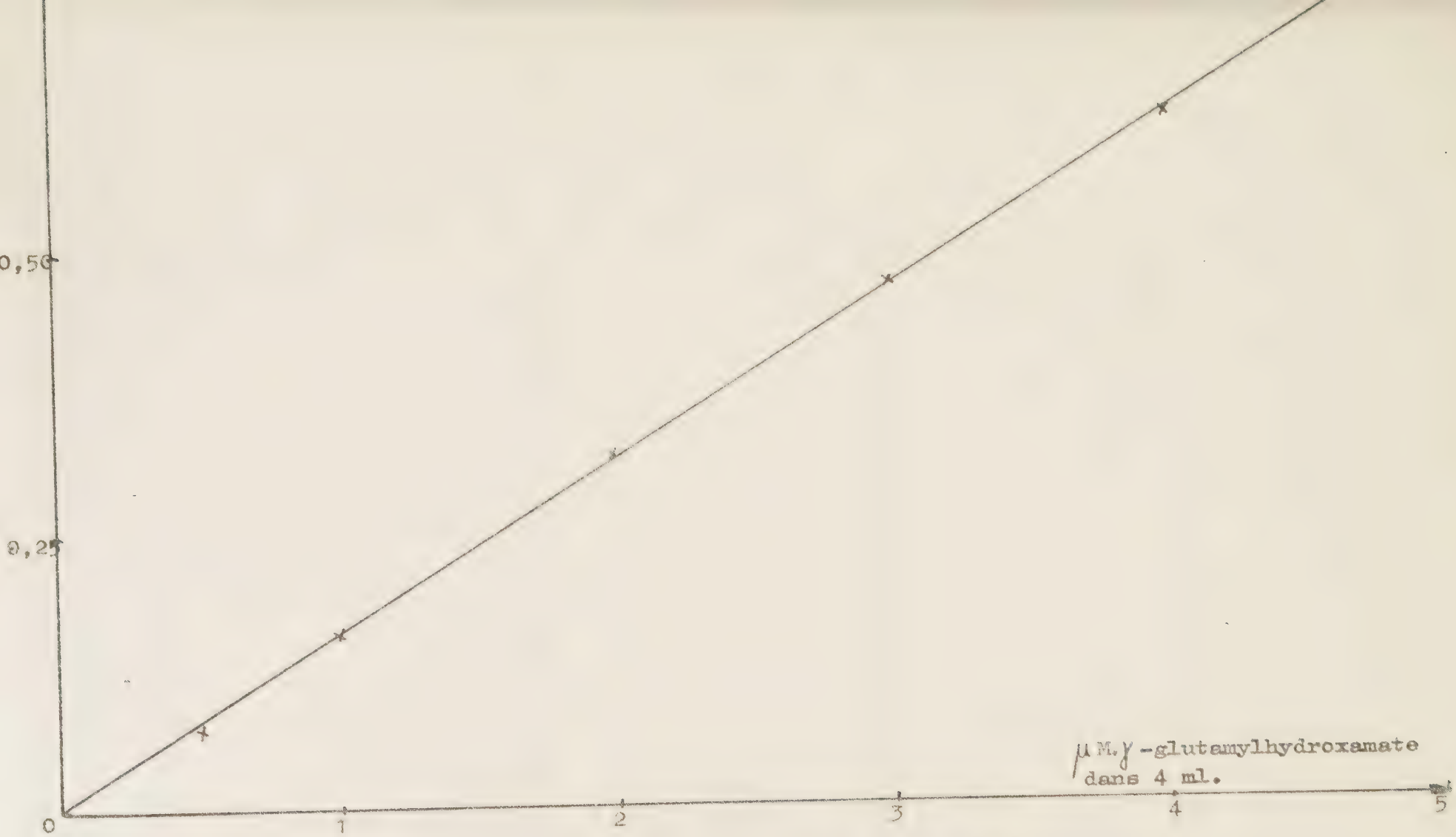


Figure 6 : Dosage du γ-glutamylhydroxamate en présence d'ions Fe^{+++}.

Le volume final est 2 ml.
L'extrait enzymatique est ajouté au temps t = 0. Un témoin sans glutamate sert de blanc.
Après une centrifugation de 15 mn à 5000 g, la densité optique du défécat est lue dans un photocolorimètre Beckman 1211 équipé d'un filtre de 540 nm

a) Mesure de la quantité de produit formé en fonction du temps (Fig.7)

Nous avons déterminé le temps d'incubation pendant lequel la relation quantité de produit formé = f (temps) est linéaire, pour différentes concentrations enzymatiques.

La quantité de produit formé est proportionnelle au temps pendant 30 mn si on se limite à des quantités comprises entre 0,4 et 1,6 µM (D.O. comprise entre 0,05 et 0,25).

b) Mesure de la quantité de produit formé en fonction de la concentration en enzyme (Fig.8)

Pour un temps d'incubation de 30 mn, nous avons tracé la courbe quantité de produit formé en fonction de la concentration en enzyme, dans les limites indiquées ci-dessus. Cette courbe est linéaire jusqu'à 1,6 µM de glutamylhydroxamate formé. (D.O.=0,25).

Dans la suite des expériences, nous veillerons à ne pas dépasser cette quantité de produit formé, pour ne pas avoir à faire de correction

c) Détermination des concentrations optima en substrats.

Nous avons tracé les différentes courbes représentant la quantité de produit formé en fonction de la concentration en un substrat, les concentrations des autres étant maintenues constantes (incubation 30 mn à 30°C). (Fig 8, a, b, c, d)
L'examen de ces courbes nous a permis de choisir les concentrations suivantes (voisines de 20 Km) :

- glutamate : 100 µM/ml
- ATP : 20 µM/ml
- Mg^{++} : 20 µM/ml
- NH_2OH : 50 µM/ml

Une concentration trop élevée en hydroxylamine semble inhiber la formation d'hydroxamate.

5) Mesure de l'activité γ-glutamyltransférase.

Le dosage consiste à mesurer la quantité de γ-glutamylhydro-

../..

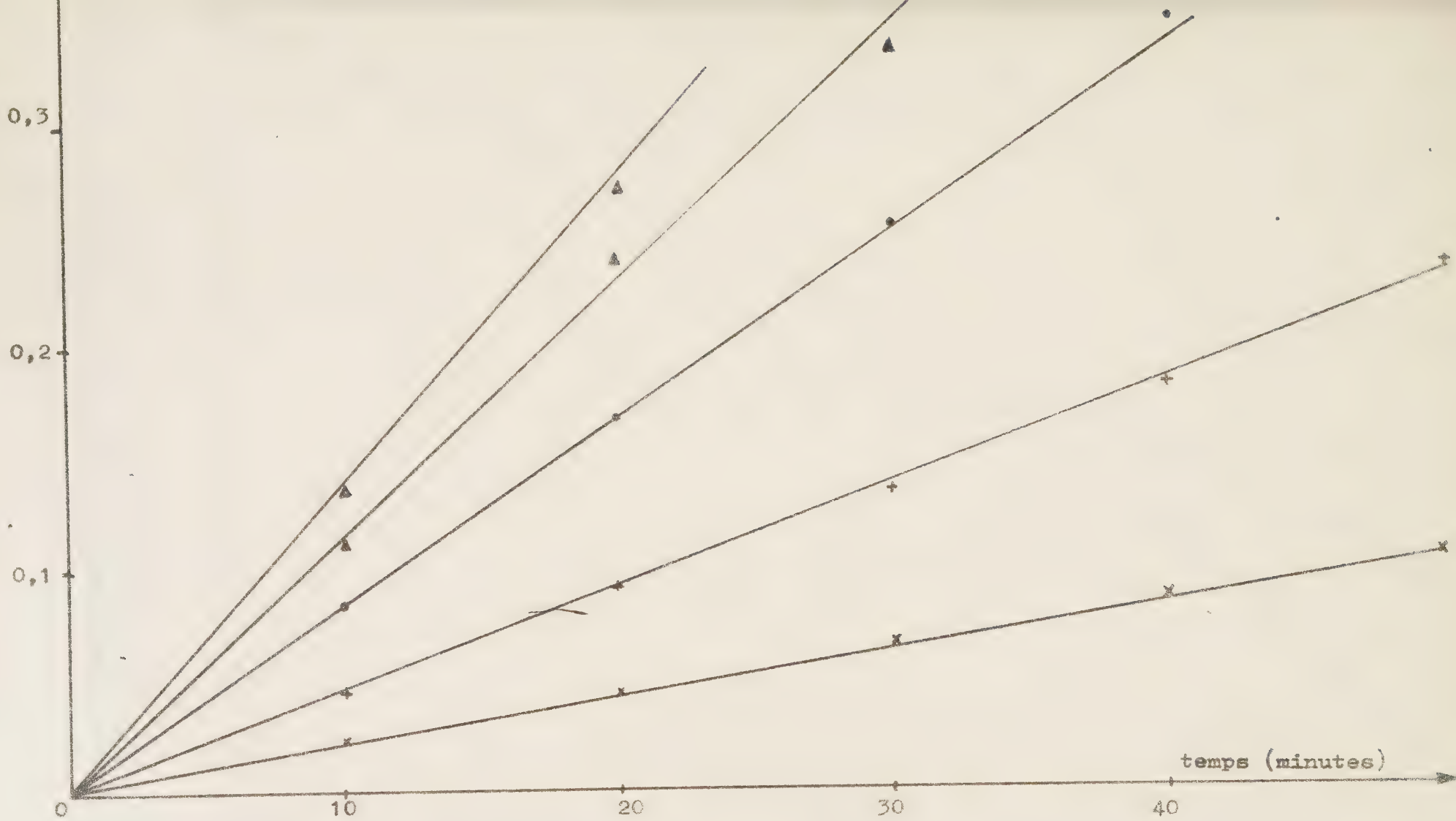


Figure 7 : Quantité de γ-glutamylhydroxamate formé en fonction du temps, pour différentes dilutions enzymatiques.

—×— 0,025 ml. , —+— 0,05 ml., —•— 0,1 ml. , —▲— 0,15 ml. , —△— 0,20 ml.

30°C , 30 mn

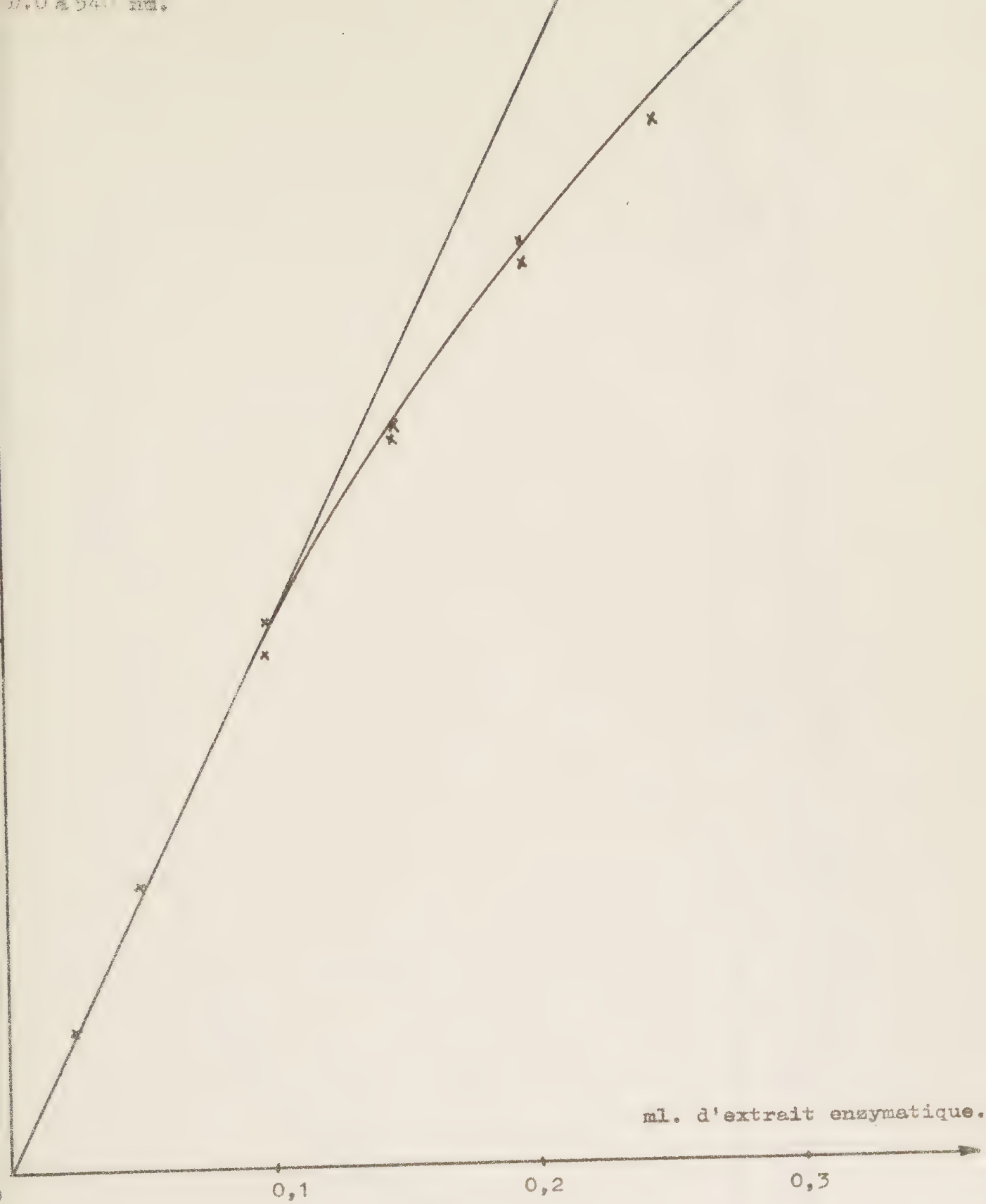


Figure 8 : Quantité de γ-glutamylhydroxamate formé en fonction de la concentration en extrait enzymatique. (exprimé en D.O.)
30°C , 30 mn.

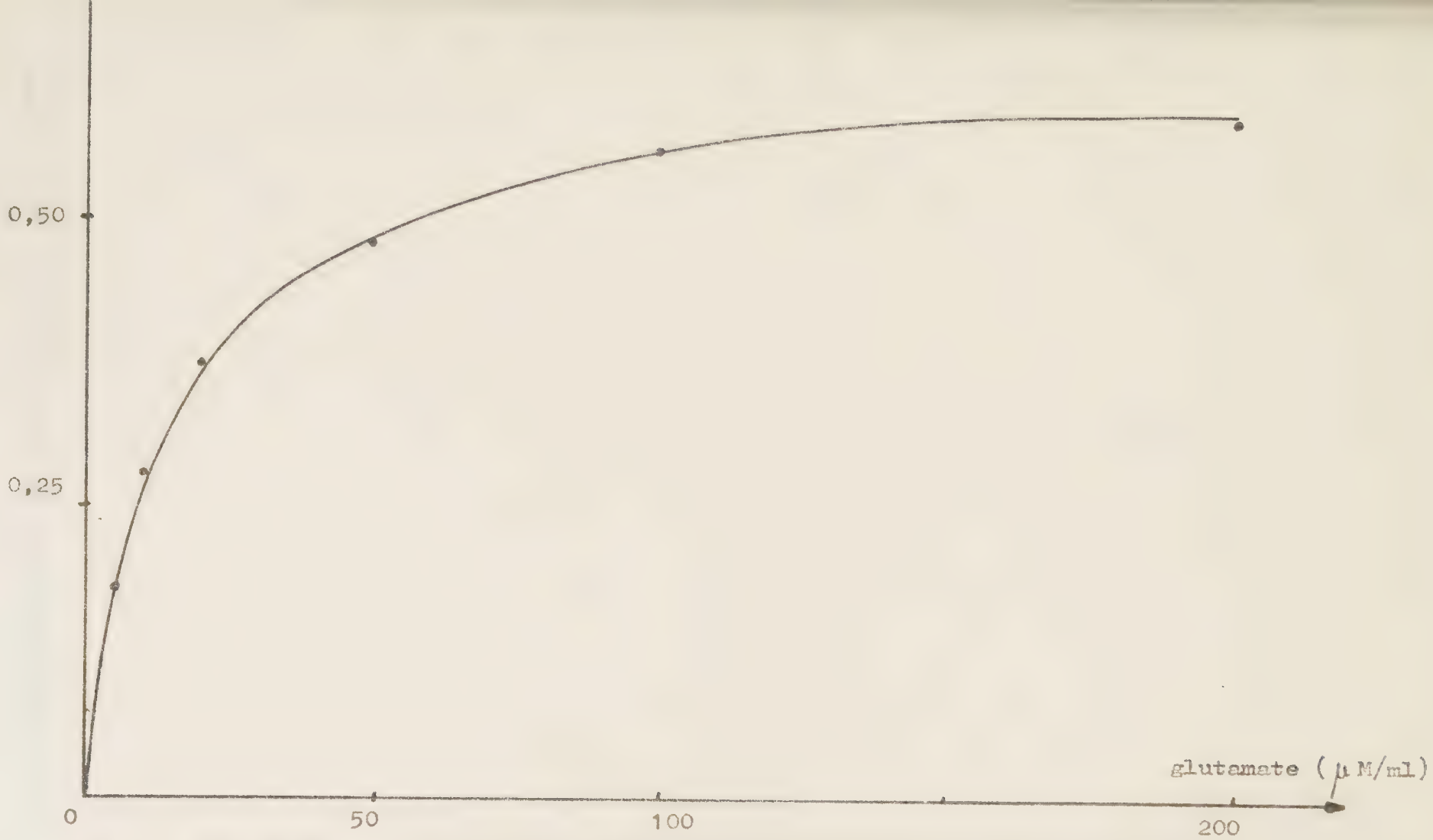


Figure 8 a : Variation de la quantité de γ-glutamylhydroxamate formé en fonction de la concentration en glutamate. (exprimé en D.O.)

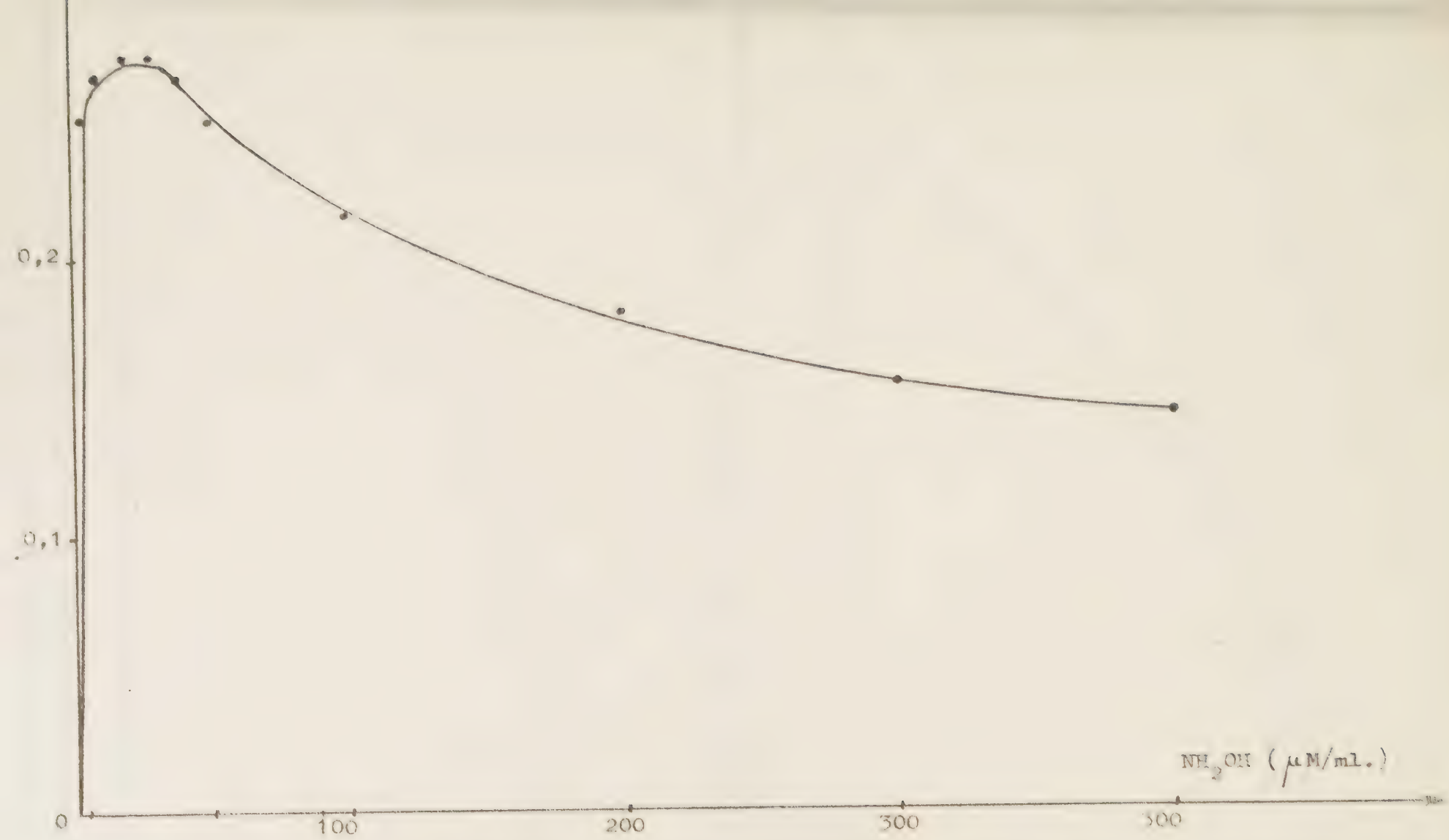


Figure 8 b : Variacion de la quantité de γ-glutamylhydroxamate formé en fonction de la concentration en hydroxylamine.(exprimé en D.O.)

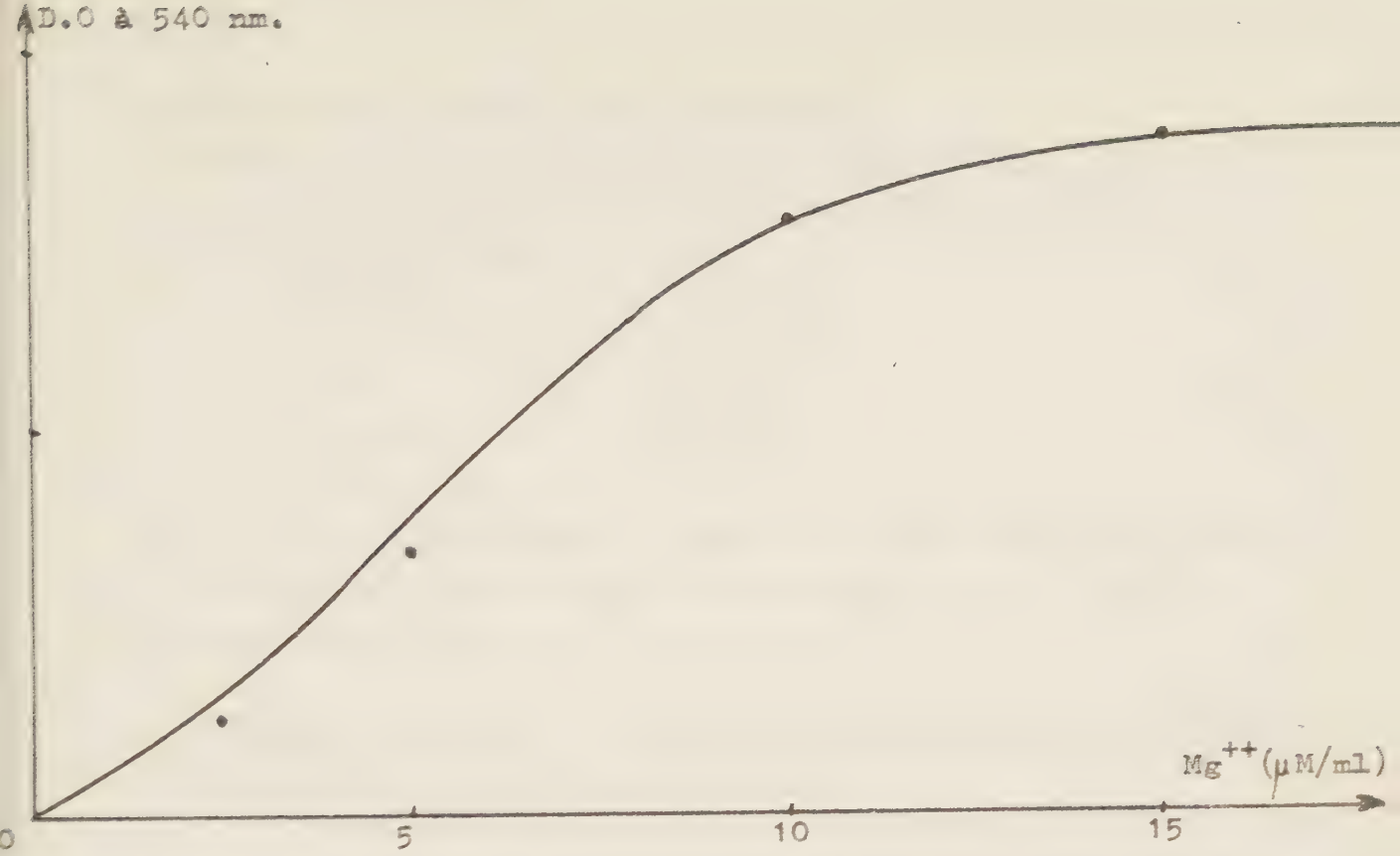


Figure 8 c : Variation de la quantité de γ-glutamylhydroxamate formé en fonction de la contration en ions Mg^{++}.(exprimé en D.O.)

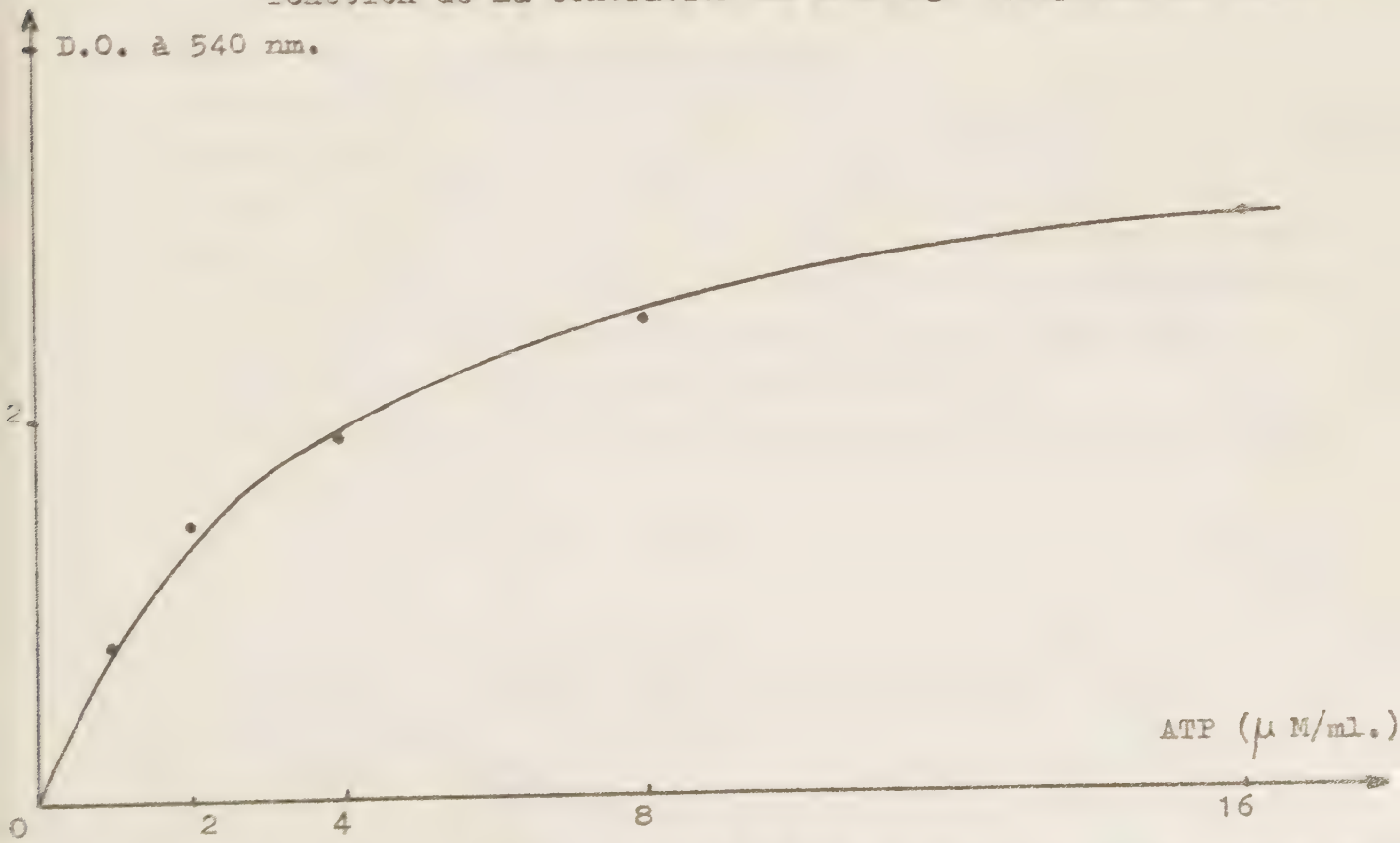


Figure 8 d : Variation de la quantité de γ-glutamylhydroxamate formé en fonction de la concentration en ATP.(exprimé en D.O.)

xamate formé à partir de la glutamine.
L'incubation s'effectue 30 mn à 30°C, le volume final est 2 ml.
Les conditions expérimentales sont celles de STADTMAN (16, 17).
Le milieu réactionnel contient :

- glutamine : 100 µM/ml
- ADP : 1 µM/ml
- Mg^{++} : 20 µM/ml
- NH_2OH : 50 µM/ml
- Tris.HCl. 0,1 M. pH. 7,2

La quantité d'hydroxamate formé est mesurée comme précedemment.
Les activités enzymatiques sont exprimées en UI. (µM de glutamylhydroxamate . mn^{-1}. mg de protéines^{-1})

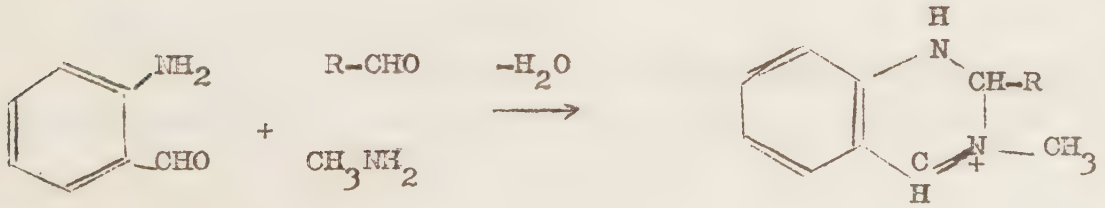
E) DOSAGE DE L'ACIDE Δ_1-PYRROLINE-5-CARBOXYLIQUE : MESURE DE L'ACTIVITE ORNITHINE TRANSAMINASE

Le composé est le produit de la transamination de l'ornithine, catalysée par l'ornithine transaminase, mais aussi celui de la réduction de l'acide glutamique en γ-glutamyl semialdéhyde, isomère cyclique du Δ_1-pyrroline-5-carboxylate.

1) Mise en évidence du composé

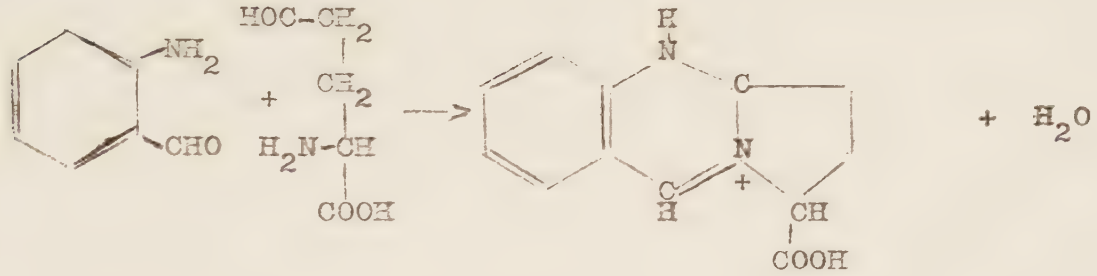
L'acide Δ_1-pyrroline-5-carboxylique, et le γ-glutamyl semialdéhyde donnent une réaction avec l'o-aminobenzaldéhyde, analogue à celle que donnent les aldéhydes aliphatiques avec ce même produit, en présence d'une amine (59). Les groupements carbonyl et amine terminaux se combinent à ceux de l'o-aminobenzaldéhyde pour former un dihydroquinazolinium, composé coloré dont le maximum d'absorption se situe vers 450 nm (60)

* réaction des aldéhydes aliphatiques avec l'o-amibenzaldéhyde



../..

* réaction du γ-glutamyl semialdéhyde avec l'o-aminobenzaldéhyde



2) Préparation du γ-glutamyl semialdéhyde.

Le produit est préparé à partir du DL-glutamic-γ-semialdéhyde diéthylmercaptal dont un échantillon (une préparation du Dr SCHOPMAN) nous a été aimablement fourni par Dr WJ. MIDDELHOVEN.

a) Mode opératoire (communication personnelle de Dr WJ. MIDDELHOVEN)

* Dissoudre 29,7 mg (125 μM) de DL glutamic -γ- semialdéhyde diéthylmercaptal dans 1 ml $HClO_4$ N
* Ajouter 74,7 mg $HgCl_2$ (275 μM) et laisser réagir 3 h à température ambiante.
* Centrifuger et recueillir le surnageant. Laver le précipité de HgS C_2H_5 Cl plusieurs fois avec H ClO_4 ,N et recueillir les surnageants.
* Ajuster à 25 ml avec H Cl O_4,N. Nous avons alors une solution qui contient 5 μM/ml de Δ_1- pyrroline-5-carboxylate.

Cette solution est stable plusieurs jours à 0°C

3) Courbe d'étalonnage (Fig.9)

On prépare une solution d'o-aminobenzaldéhyde à 12,1 mg/ml d'éthanol à 50 % et on réalise la série de tubes suivante :

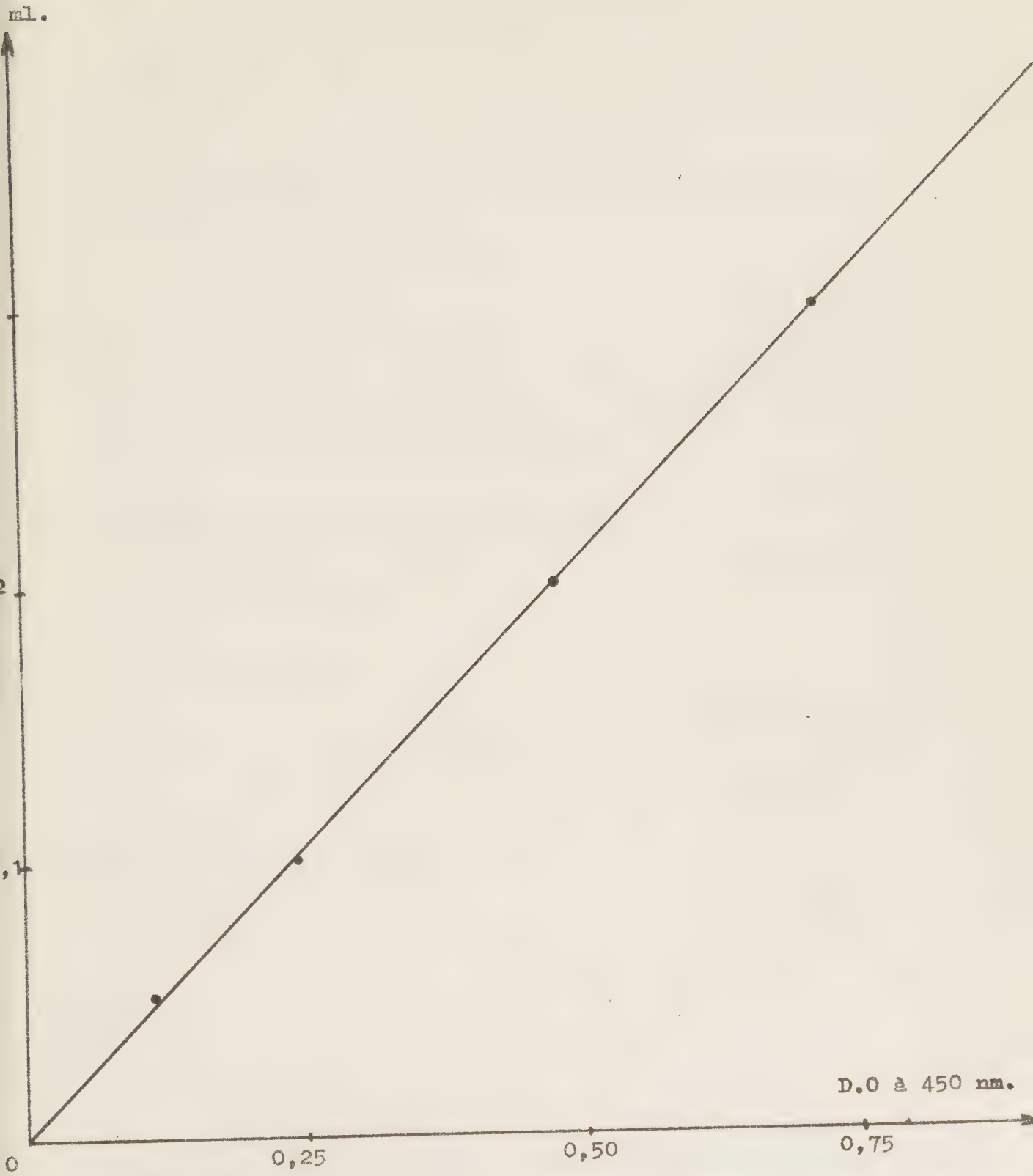


Figure 9 : Dosage du $\Delta_1$pyrroline-5-carboxylate par l'o-aminobenzaldéhyde.

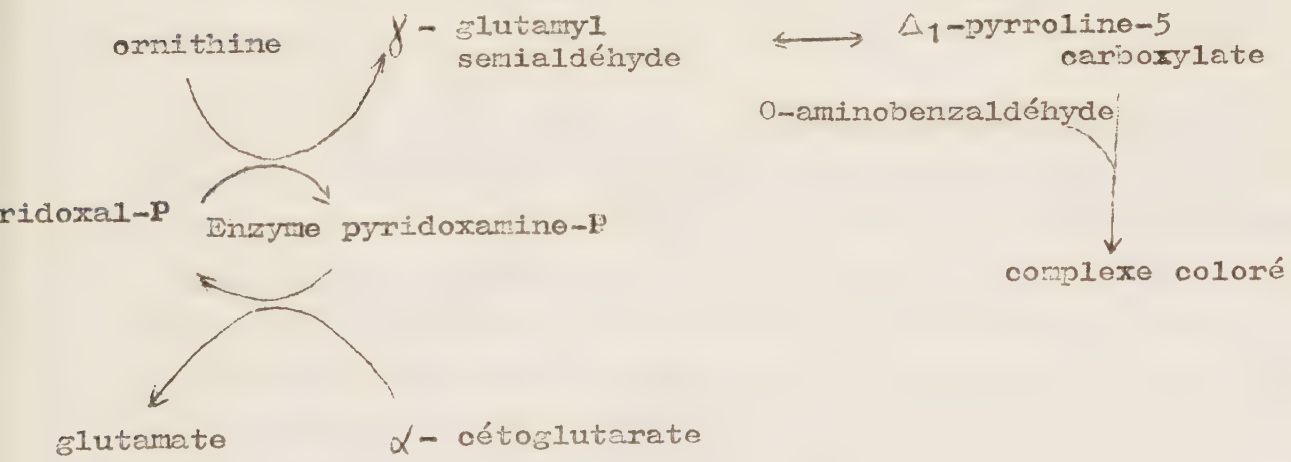
$HClO_4$ N/10(ml)	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9	8,9
O-aminobenzaldéhyde (ml)	0,1									
solution de Δ_1-pyrroline-5-carboxylate (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1

Nous avons alors une gamme étalon de 0,05 à 0,4 μM/ml de Δ1- pyrroline-5-carboxylate dans 10 ml de solution. La densité optique est lue à 450 nm après un séjour de 20 h à 0°C, par rapport à un témpin contenant 9,9 ml $HClO_4$ N/10 et 0,1 ml de la solution d'o-aminobenzaldéhyde.

4) Dosage de l'ornithine transaminase.

La méthode employée est celle de WJ. MIDDELHOVEN (61) légèrement modifiée.

a) Principe



b) Mode opératoire

Préincuber 10 mn à 30°C dans un tube à essais 1,5 ml d'une solution contenant :
- 100 μM de tampon phosphate pH 7,4
- 20 μM de chlorhydrate d'ornithine
- 20 μM d'α-cétoglutarate monosodique
- 10 μM de $MgCl_2$

../..

- 1 μM de pyridoxal-5-phosphate
- 10 μM d'o-aminobenzaldéhyde

On ajoute 0,5 ml d'extrait enzymatique au temps 0. Après 30 mn d'incubation à 30°C, la réaction est arrêtée par addition de 1 ml de $HClO_4$,N. On ajoute ensuite 7 ml d'eau distillée, ce qui porte le volume à 10 ml.

La densité optique est lue dans le surnageant à 450 nm; après 20 h de séjour à 0°C et une centrifugation de 5 mn à 5 000g.

L'activité de l'enzyme est exprimée en UI : μM de Δ_1-pyrroline-5-carboxylate formé par mn et par mg de protéines.

* Remarque

Nous avions envisagé d'étudier la réaction de réduction du glutamate en γ-semialdéhyde glutamique en utilisant le procédé mis au point par STRECKER (20) pour E. coli 55.1. Les cellules entières de ce microorganisme sont incubées en présence d'acide glutamique, d'ions Mg^{++} et d'acide pyruvique en tampon phosphate pH. 7,2. Le Δ_1-pyrroline-5-carboxylate formé s'accumule dans le milieu, il réagit avec l'o-aminobenzaldéhyde ajouté en fin de réaction.

Des obstacles considérables nous ont fait renoncer à ce travail :

- STRECKER emploie une souche qui accumule le Δ_1-pyrroline-5-carboxylate, il peut donc ajouter l'o-aminobenzaldéhyde en fin de réaction.

- Dans notre cas, il est nécessaire de piéger le Δ_1-pyrroline-5-carboxylate par l'o-aminobenzaldéhyde au fur et à mesure de sa formation. Or il se forme au cours de la réaction d'autres produits qui réagissent avec le colorant. En effet dans le dosage de l'ornithine transaminase, la coloration obtenue est parfaitement stable, alors que celle obtenue avec le glutamate comme substrat, en présence de pyruvate disparaît très rapidement. Les deux colorations présentent néanmoins un maximum d'absorption pour la même longueur d'onde. L'isolement du Δ_1-pyrroline-5-carboxylate est possible en chromatographie sur papier, mais le procédé n'est pas quantitatif (62).

../..

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons recherché des mutants affectés quant au métabolisme de la proline dans le but de disposer d'un matériel de base pour l'étude du métabolisme de cet acide aminé chez la levure. Un mutant isolé comme proline⁻ a été obtenu.

Dans un premier temps, nous avons essayé de localiser la coupure sur la voie de biosynthèse. Pour cela nous avons d'abord recueilli le maximum de renseignements sur le comportement de notre souche vis-à-vis des acides aminés de la famille du glutamate, en le comparant à celui de la souche sauvage, cultivée dans les mêmes conditions.

Des dosages enzymatiques ont ensuite permis de mettre en évidence la nature de la première étape de biosynthèse de la proline.

A - COMPORTEMENT DE LA SOUCHE PRO⁻, COMPARE A CELUI DE LA SOUCHE SAUVAGE, VIS-A-VIS DES ACIDES AMINES DE LA FAMILLE DU GLUTAMATE.

Deux séries d'expériences ont été réalisées. Dans un cas, les cellules précultivées sur le milieu YEP sont prélevées en phase exponentielle. Dans l'autre cas, la préculture sur milieu 1 supplémenté en proline est prolongée 24 h après la phase exponentielle de façon à avoir des cellules dont le pool des acides aminés soit très faible (la source d'azote étant limitante).

Les mesures de croissance sont effectuées sur le milieu 1 supplémenté de façon variable.

1. Inoculum récolté en phase exponentielle (Fig. 10 à 16)

a) Souche sauvage

Le temps de génération est d'environ 2 h, quel que soit le milieu utilisé. Dans le cas d'une culture sur $(NH_4)_2SO_4$ + lysine, on observe le phénomène découvert par C. BOUGEOIS (63) : légère augmentation de la vitesse de croissance au cours de la phase exponentielle et blocage prématuré de la croissance

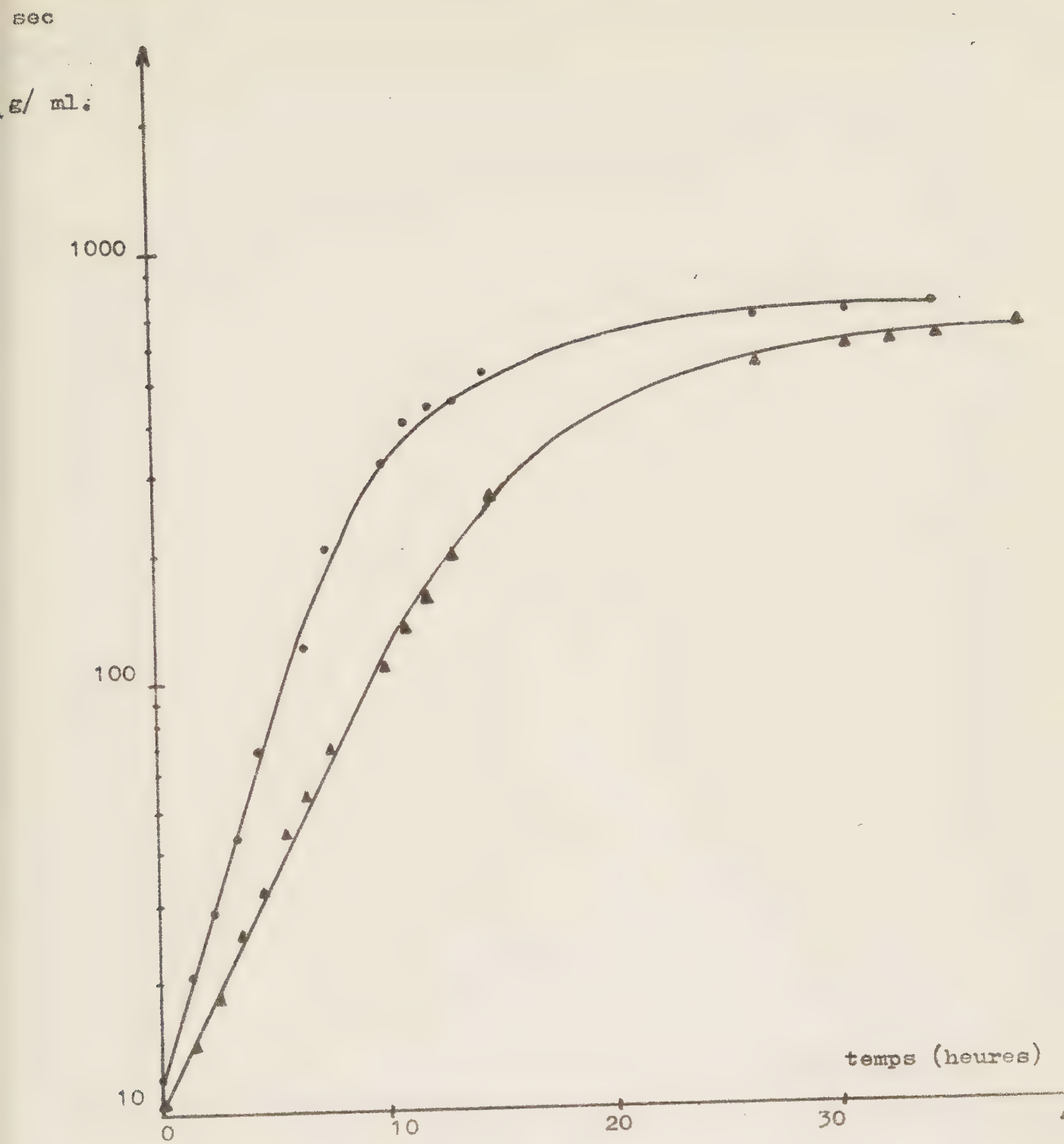


Figure 10 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M + ornithine 5.10^{-}
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

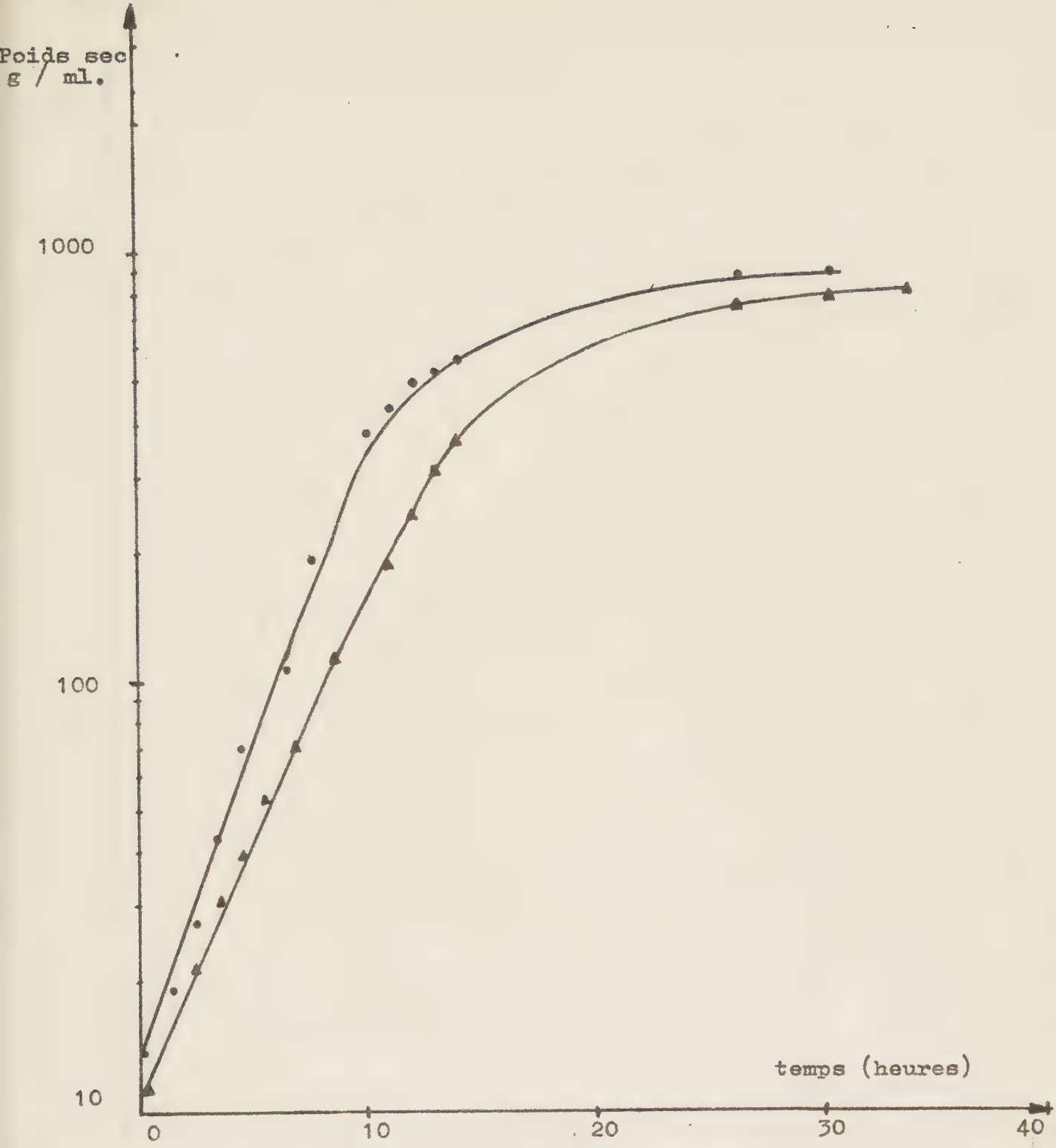


Figure 11 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M + proline 10^{-3}M
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

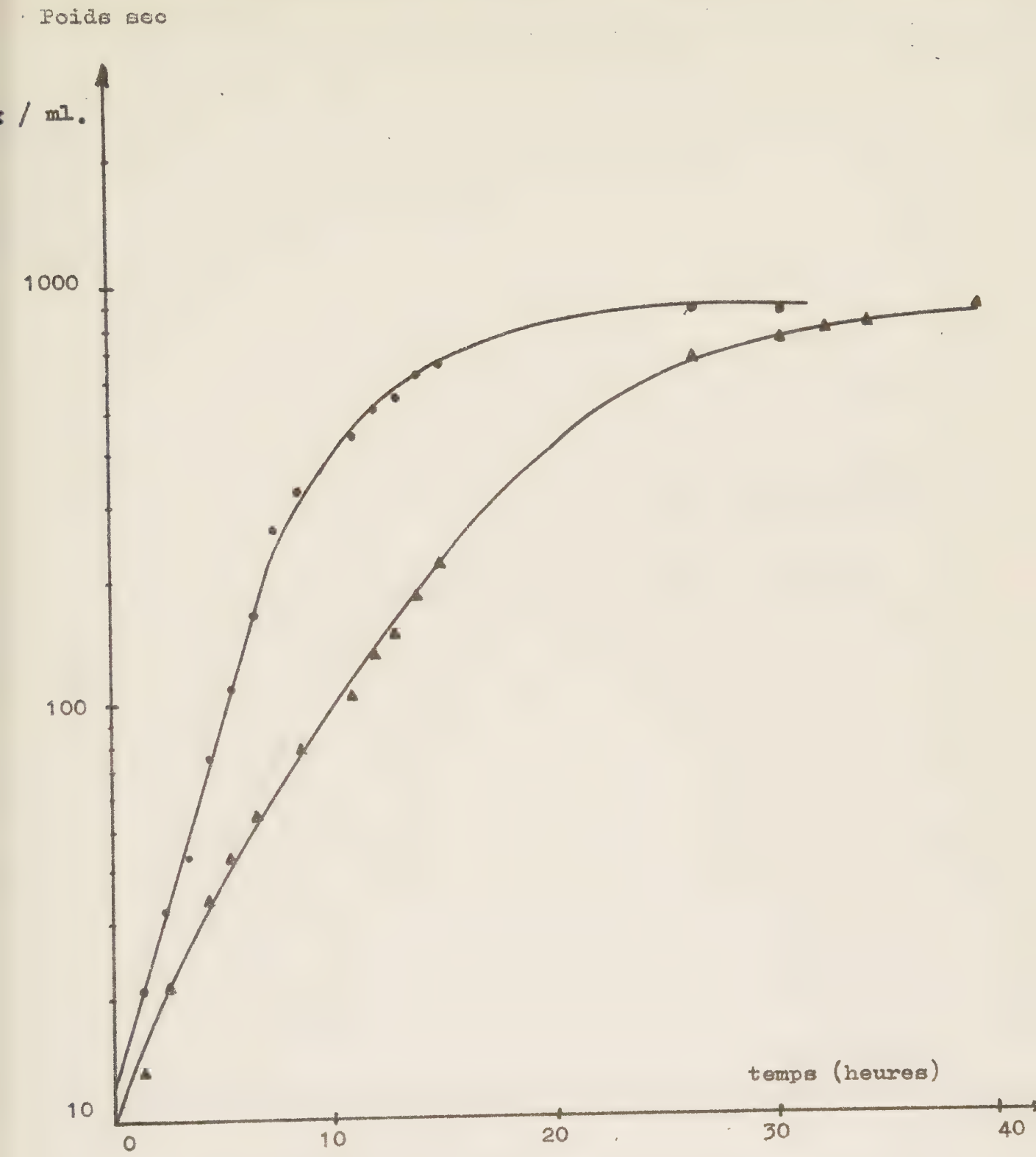


Figure 12 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ + arginine.
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

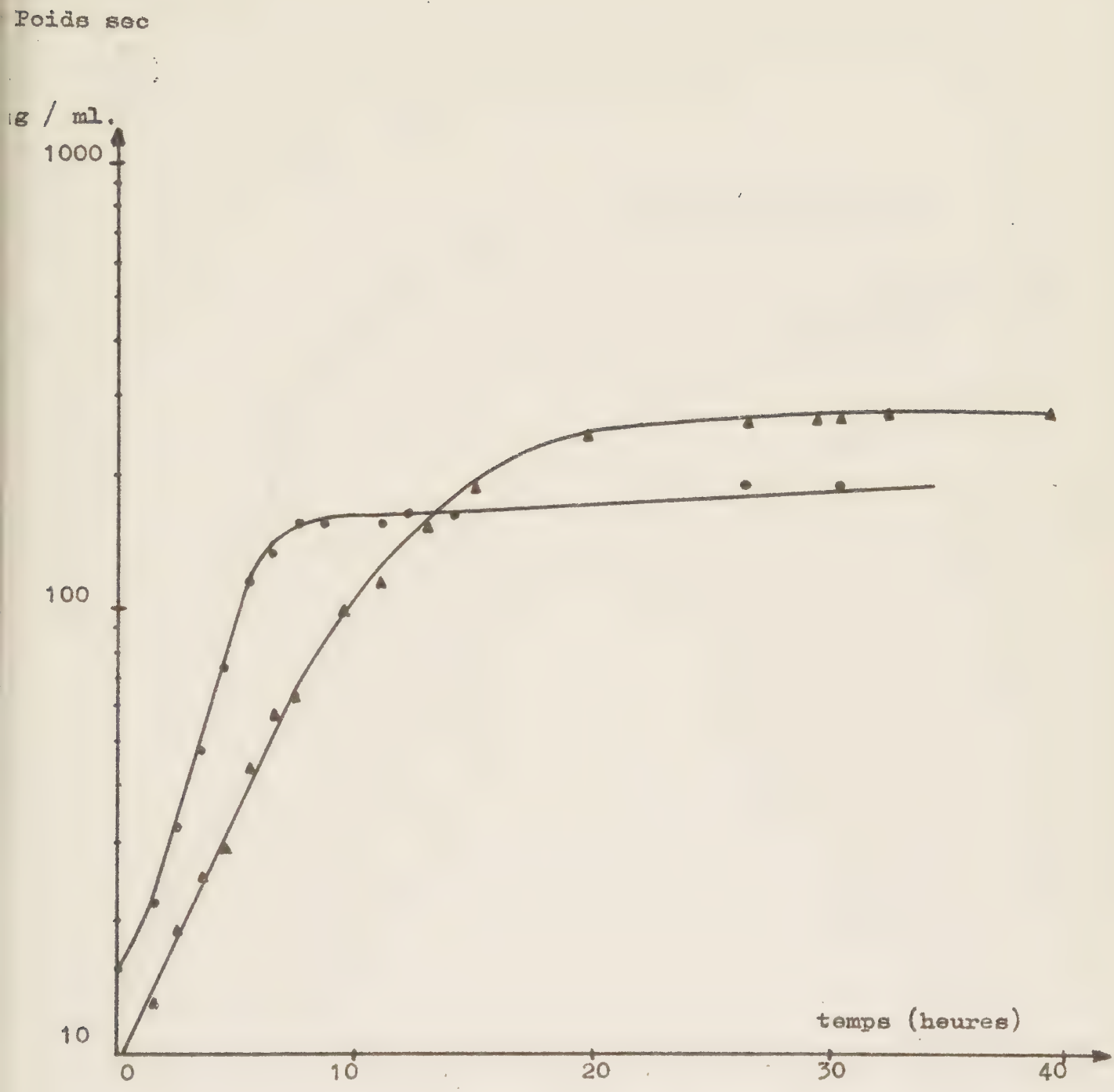


Figure 13 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4}M + lysine 5.10^{-4} M.
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

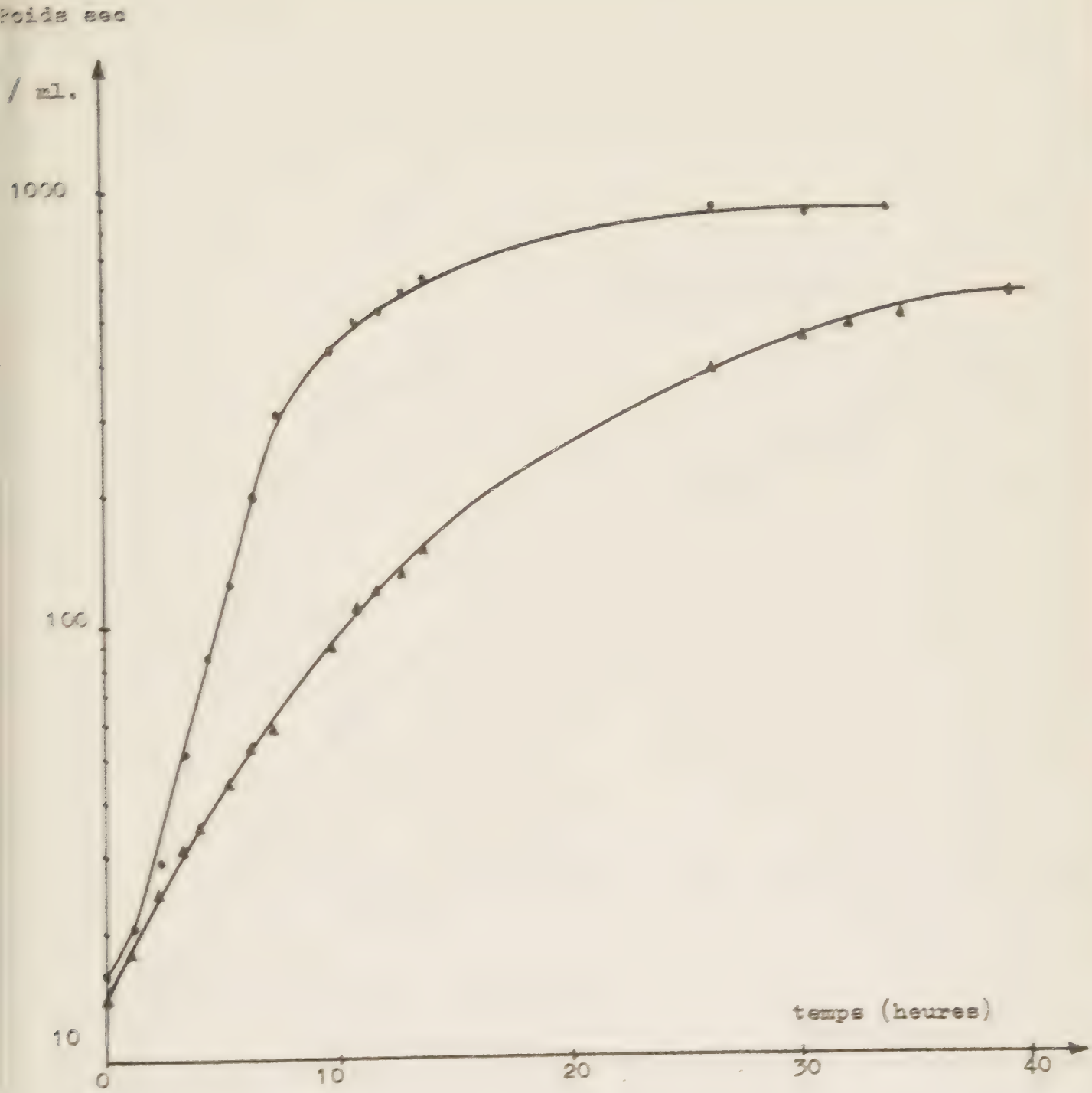


Figure 14 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M + glutamate 10^{-3} M .
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

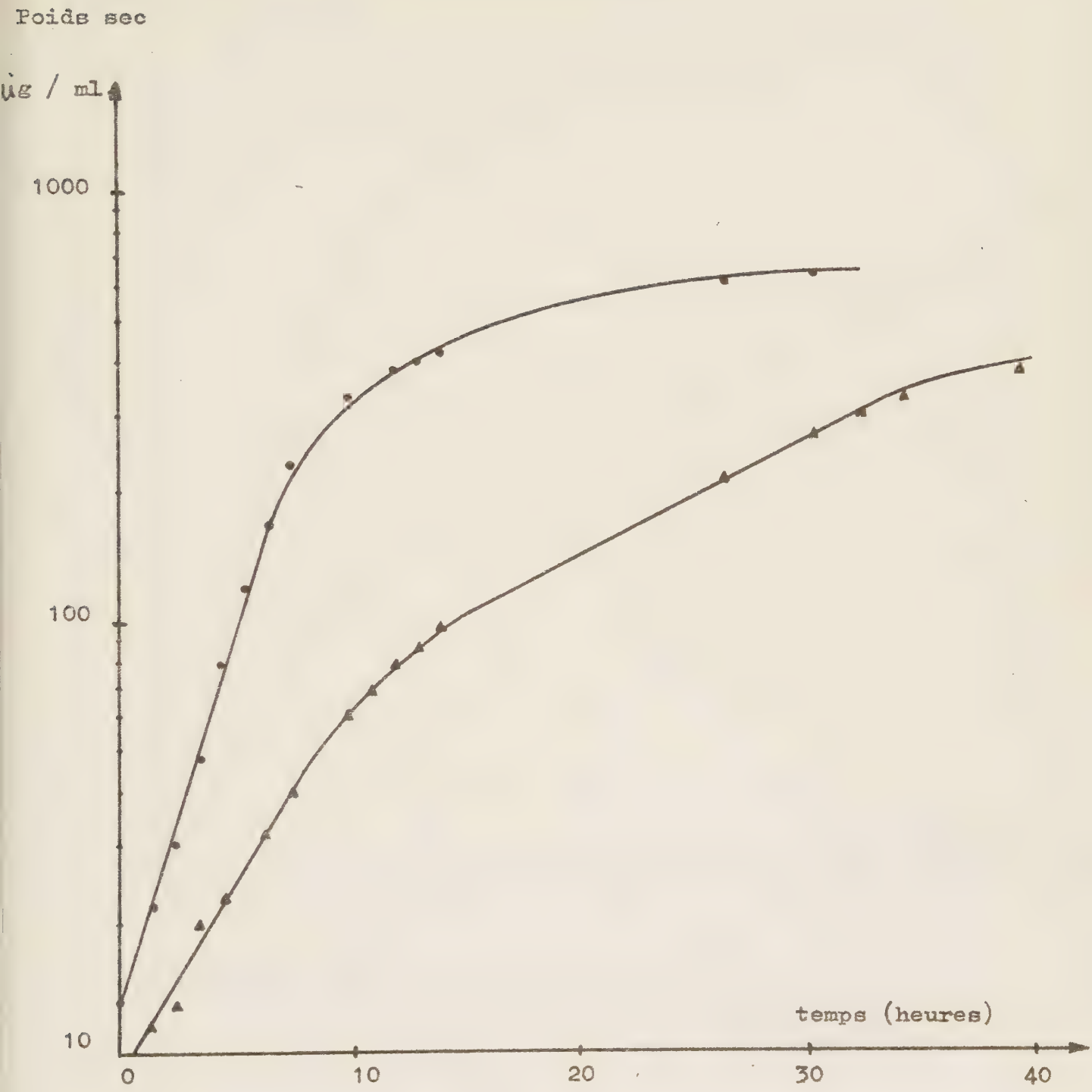


Figure 15 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M. + glutamine 5.10^{-4} M.
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

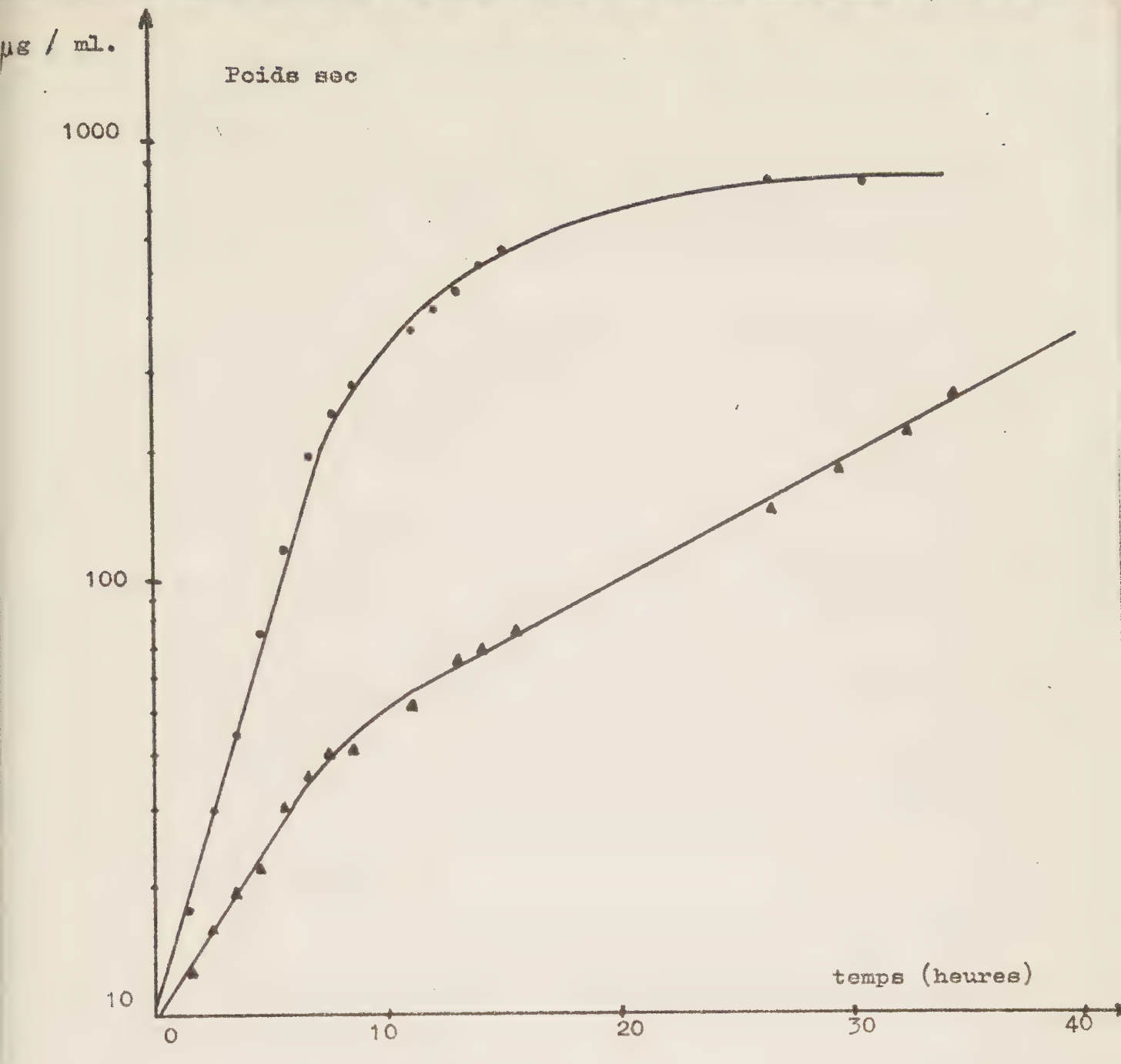


Figure 16 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 10^{-3} M.
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Mutant proline$^-$: —▲— ;souche sauvage : —●—

post-exponentielle.

b) Souche mutante

Les cultures sur proline, ornithine, arginine ou lysine présentent une phase exponentielle bien caractérisée, avec des temps de génération respectivement de 2 h 45, 3 h, 4 h et 3 h.

Dans le cas où les cultures sont réalisées sur acide glutamique, glutamine ou $(NH_4)_2SO_4$ uniquement, au contraire on n'observe plus de phase exponentielle, le temps de génération s'allongeant progressivement. Ces faits ne peuvent être imputés à des phénomènes de réversions : on aurait au contraire une diminution du temps de génération.

Ils s'expliquent probablement par un épuisement progressif des pools intracellulaires d'ornithine, arginine et proline. S'il en est ainsi, l'utilisation d'un inoculum privé d'azote doit fournir une réponse plus claire.

2. Inoculum prélevé après 24 h de privation azotée (Fig. 17 à 24)

a) Souche sauvage

Quel que soit le milieu utilisé, la phase de latence varie peu (3 h 30 à 4 h 30) et le temps de génération au cours de la phase exponentielle est constant : 2 h.

b) Souche mutante

Dans le cas du milidu supplémenté en proline, la phase de latence est identique à celle observée avec la souche sauvage (3 h 1/2) le temps de génération est 2 h 45, comme le cas d'un inoculum prélevé en phase exponentielle.

Sur les milieux supplémentés en ornithine ou en arginine, le temps de génération d'abord de 8 h diminue jusqu'à 4 h.

Sur des milieux supplémentés en acide glutamique, glutamine, lysine ou sur $(NH_4)_2SO_4$, on observe une longue phase de latence, de l'ordre de 15 h, plus courte pour la lysine, et une croissance lente avec des temps de génération de l'ordre de 9 h.

3. Discussion

De ces 2 séries d'expériences, on peut conclure que la proline est le seul supplément exogène capable de rendre à la croissance du mutant un aspect normal, avec un temps de génération assez faible.

../..

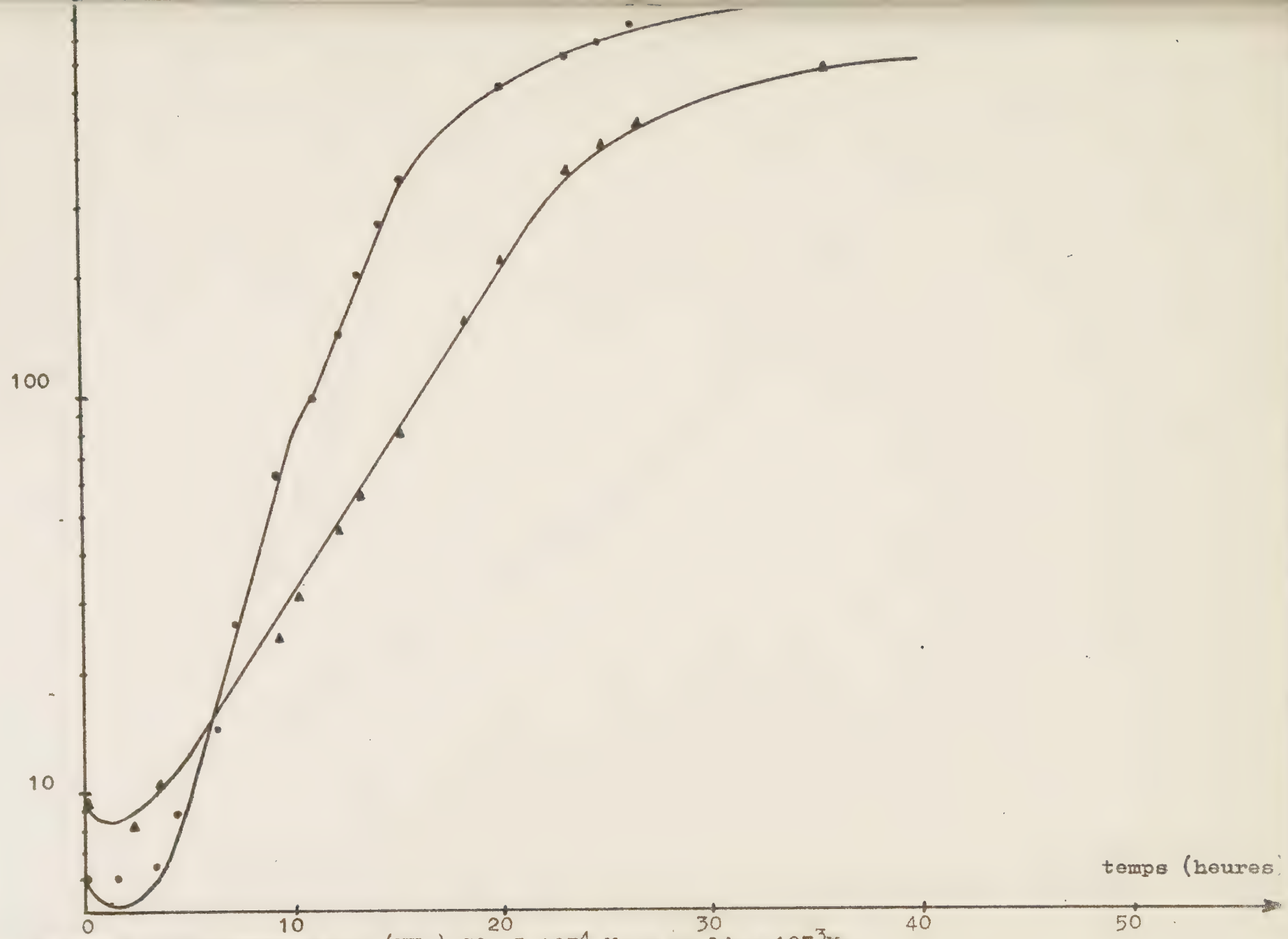


Figure 17 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M. + proline 10^{-3}M.
Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée.
Mutant proline$^-$: ——▲—— ; souche sauvage : ——●——

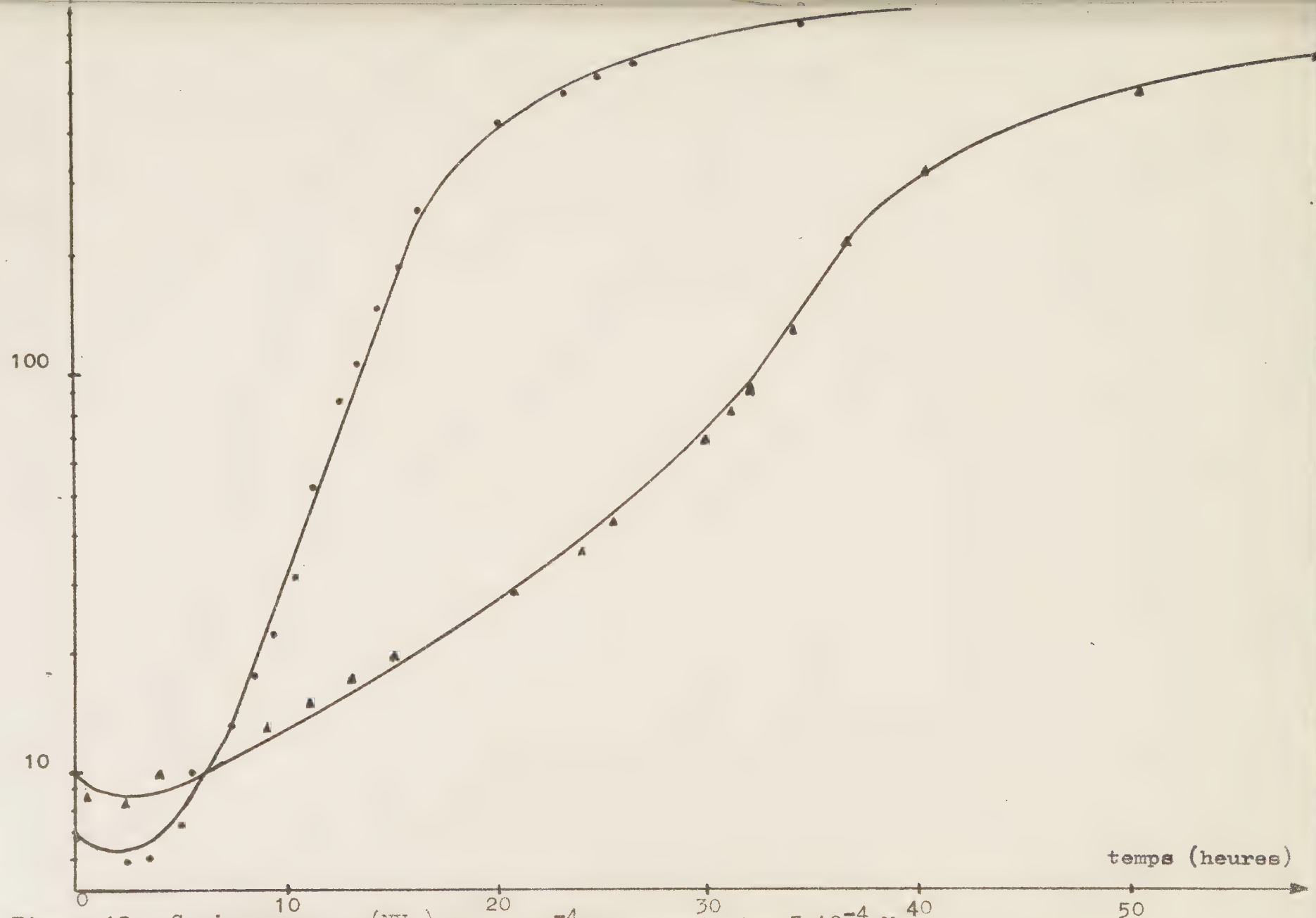


Figure 18 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M. + ornithine 5.10^{-4} M.

Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée.

Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

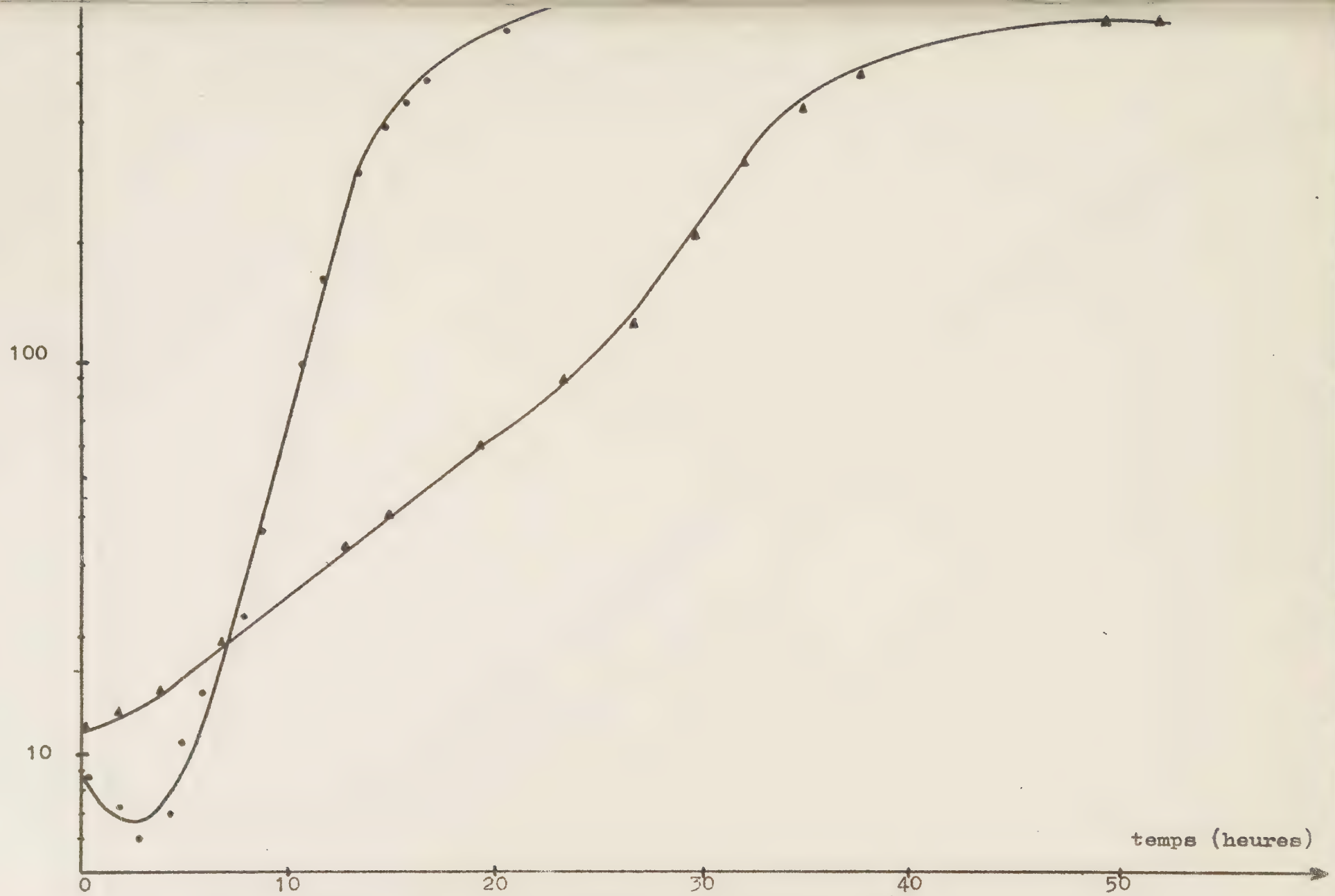


Figure 19 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M. + arginine 3.10^{-4}M.
Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

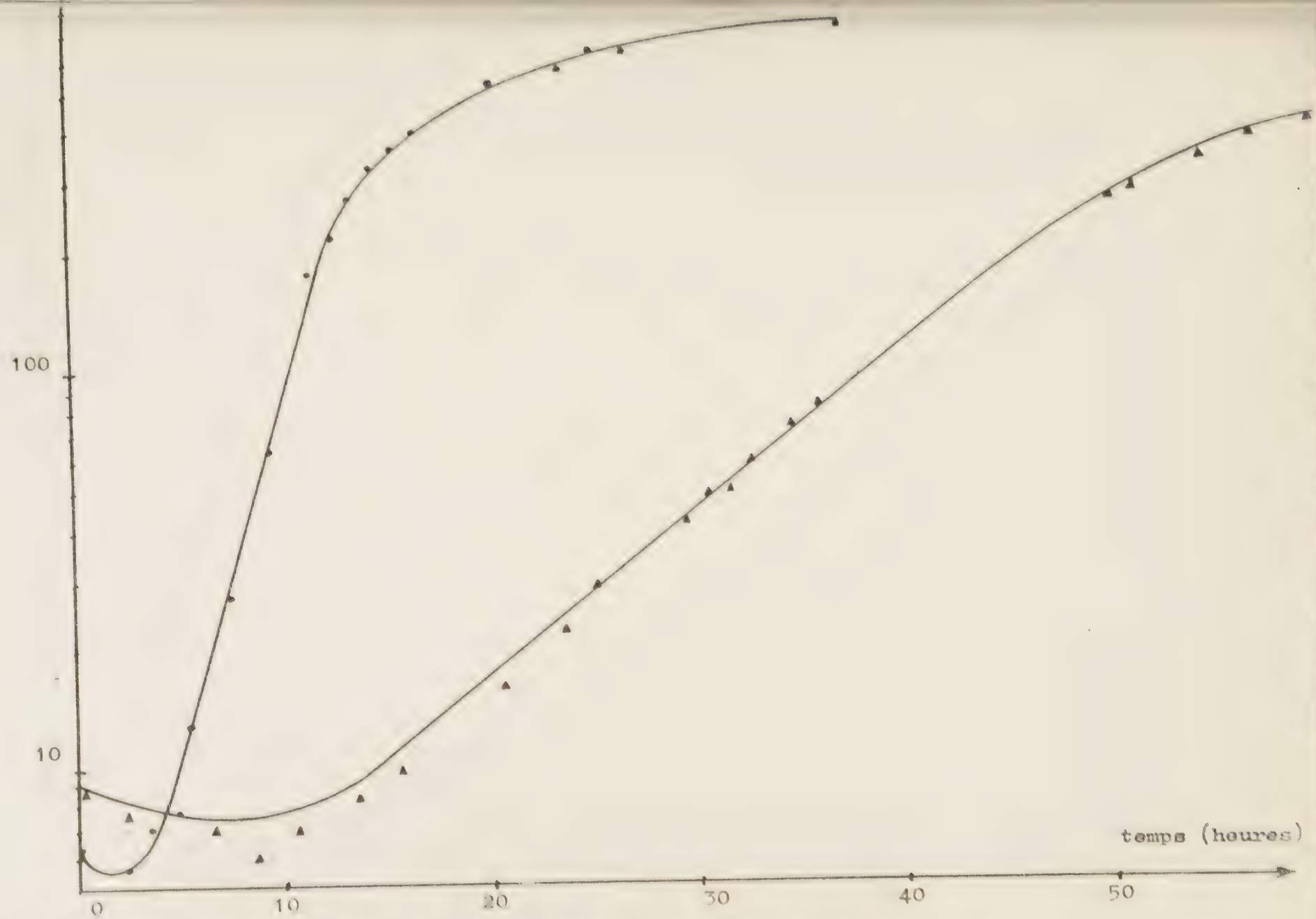


Figure 20 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M + glutamine 5.10^{-4} M.
Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée.
Mutant proline : —▲— ; souche sauvage : —●—

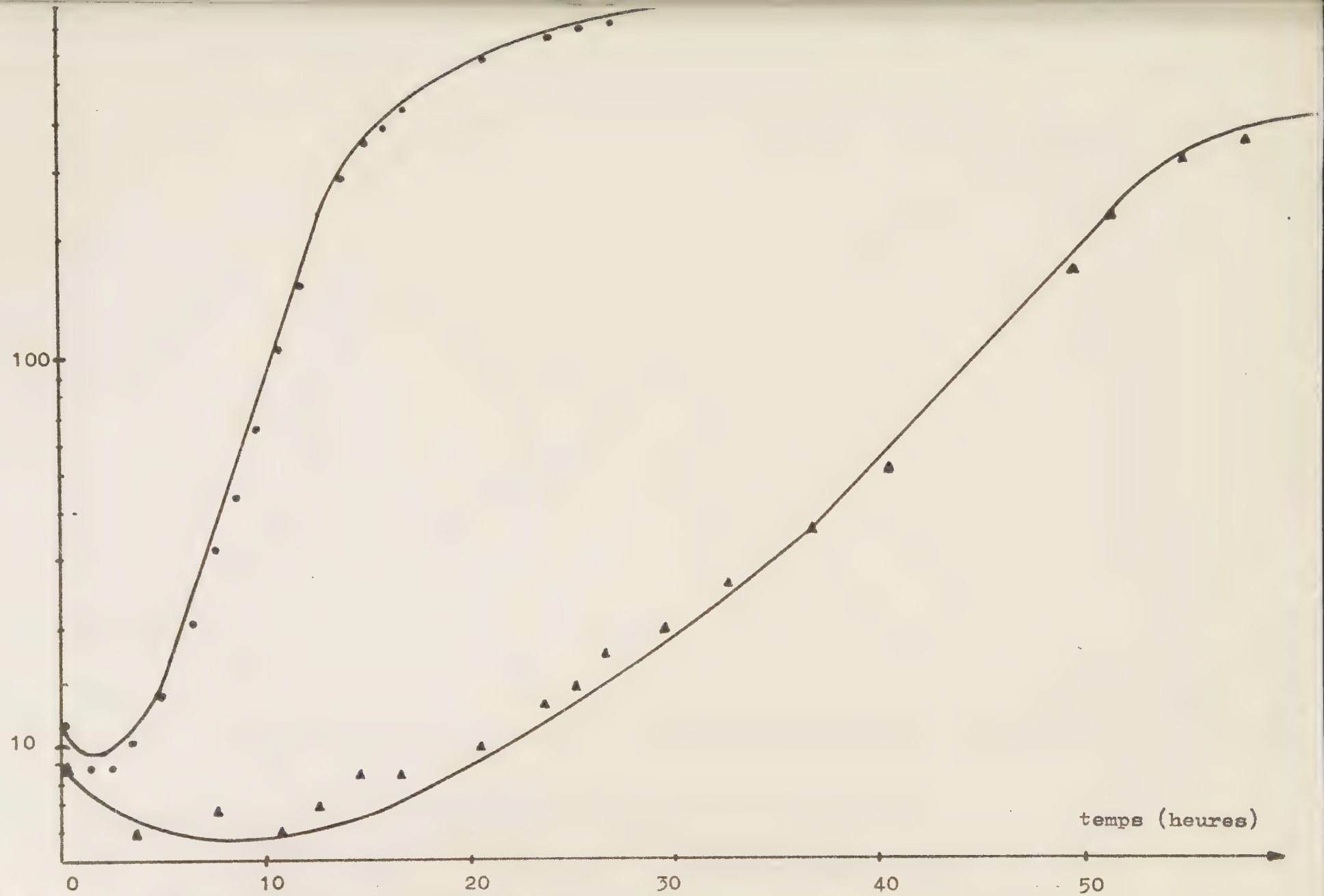


Figure 21 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4}M + glutamate 10^{-3} M.
Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

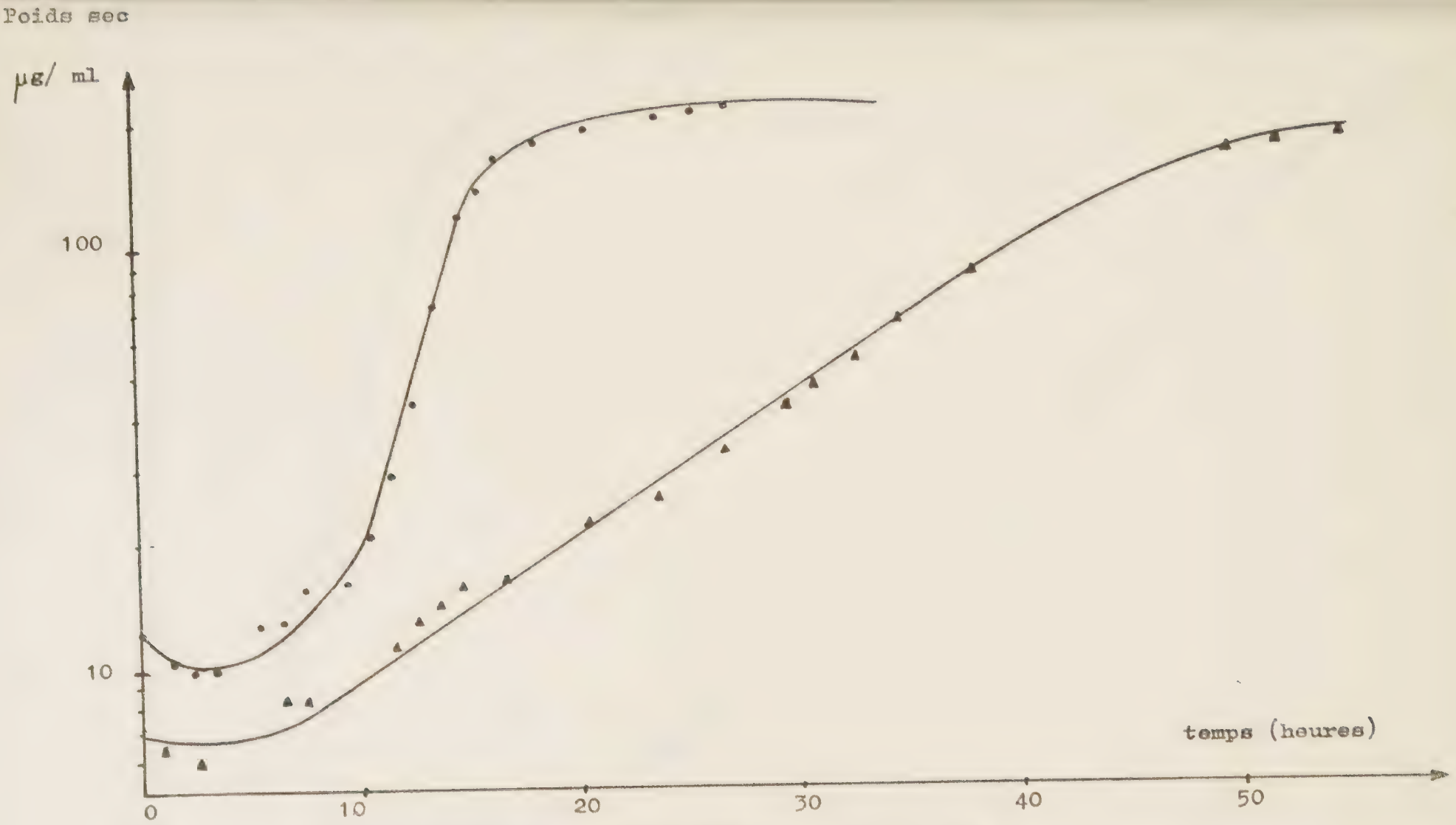


Figure 22 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M. + lysine 5.10^{-4} M.
Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●—

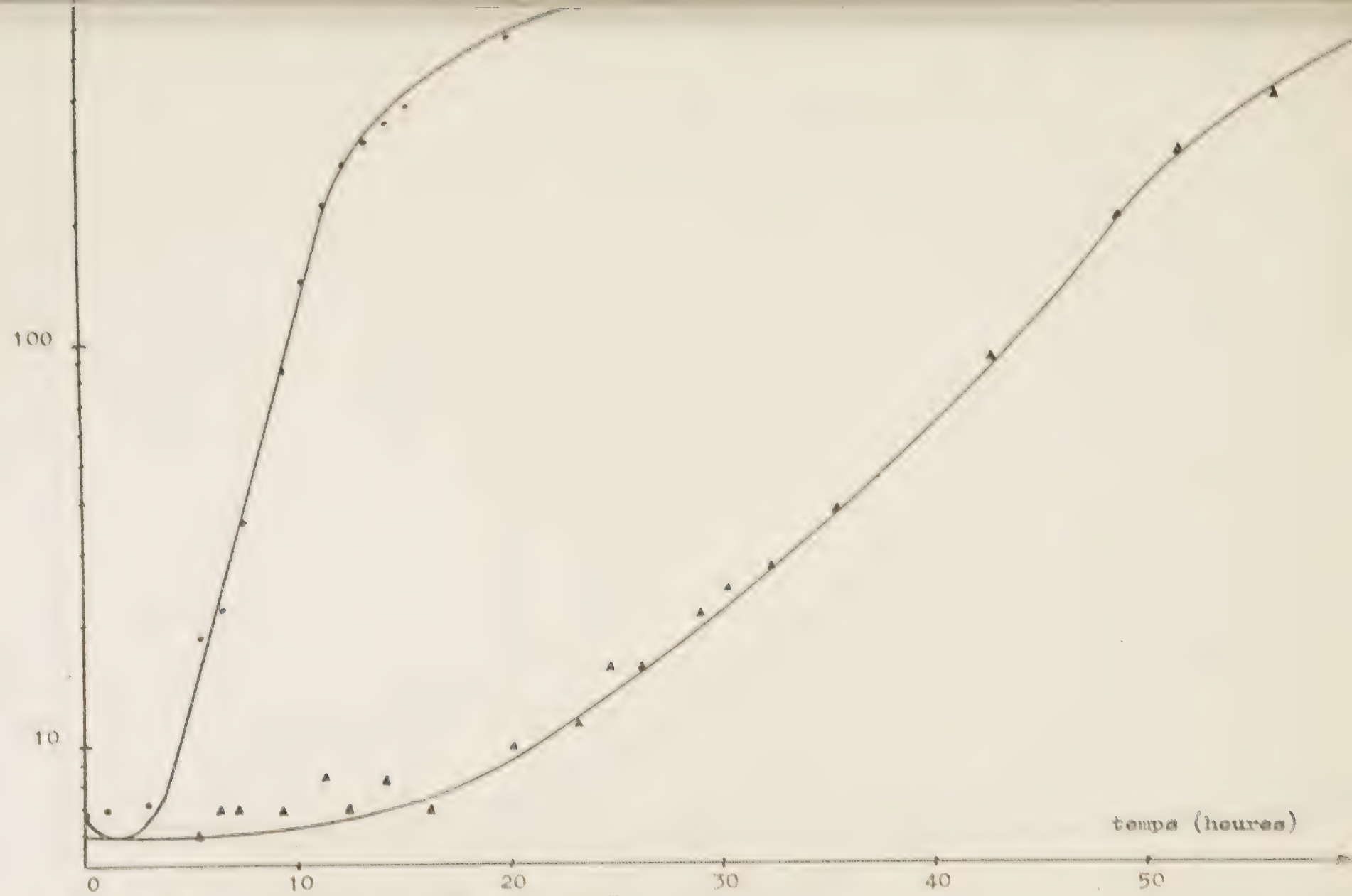


Figure 23 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 10^{-3} M.
Inoculum prélevé après privation d'azote de 24 h.
Mutant proline⁻ : —▲— souche sauvage : —●—

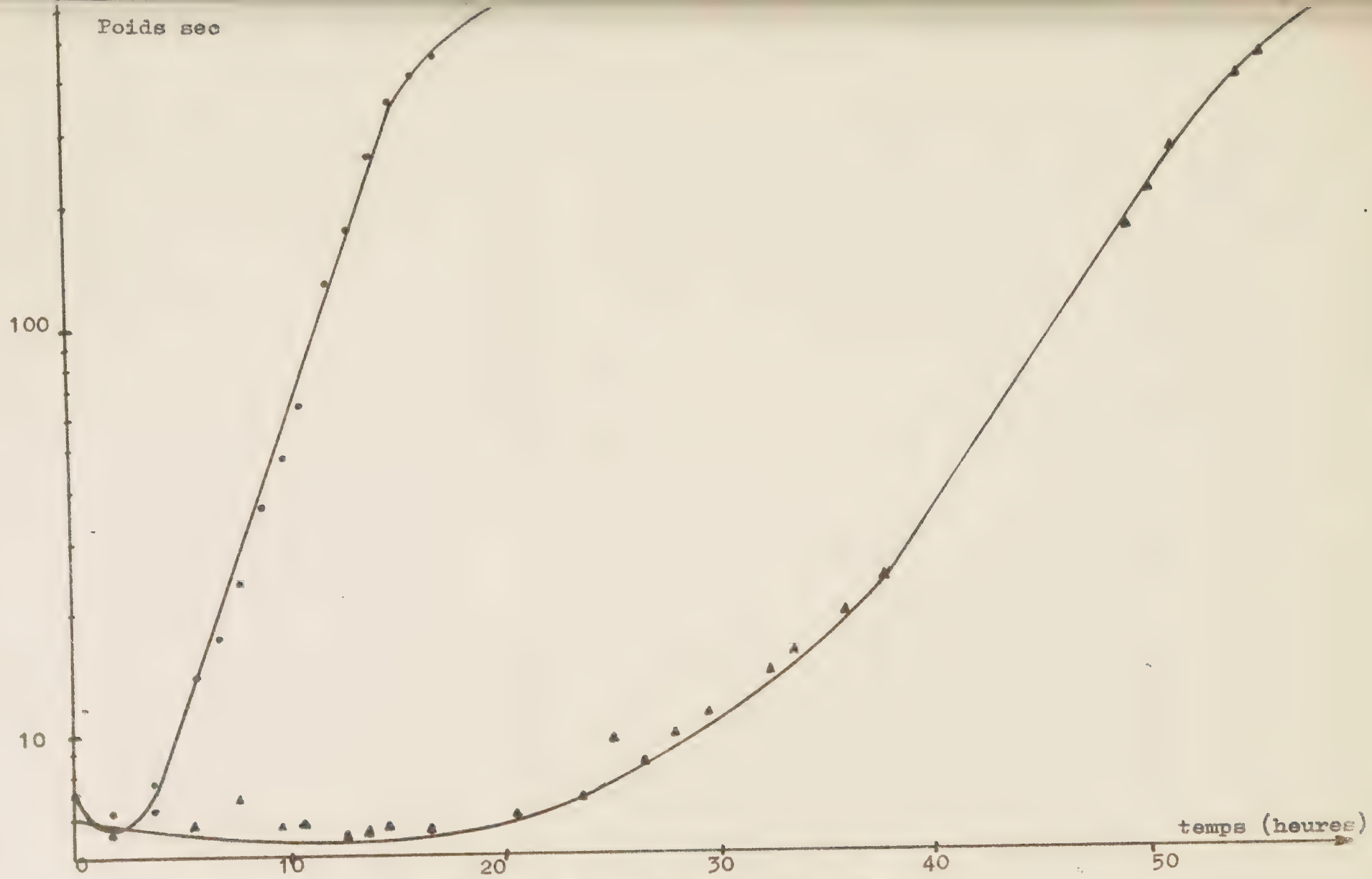


Figure 24 : Croissance sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4} M. + valine 10^{-3}M.
Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée.
Mutant proline$^-$: —▲— ; souche sauvage : —●— .

L'ornithine et l'arginine ont encore une certaine efficacité alors que les autres acides aminés n'ont pas plus d'effet que les ions NH_4^+.

La mutation étudiée n'affecte certainement pas la transformation du Δ_1-pyrroline-5-carboxylate en proline, car on aurait une exigence nutritionnelle stricte pour la proline.

Au contraire, une mutation affectant l'étape de transformation: acide glutamique $\longrightarrow$ γ-glutamyl semialdéhyde est susceptible de rendre compte des faits observés. En effet, il est possible que l'ornithine et l'arginine exogènes soient transformés en γ-glutamyl semialdéhyde par l'ornithine transaminase. La faible activité de cette enzyme sur milieu minimum (64) expliquerait la faible vitesse de croissance du mutant sur acide glutamique, glutamine ou $(NH_4)_2SO_4$ seul.

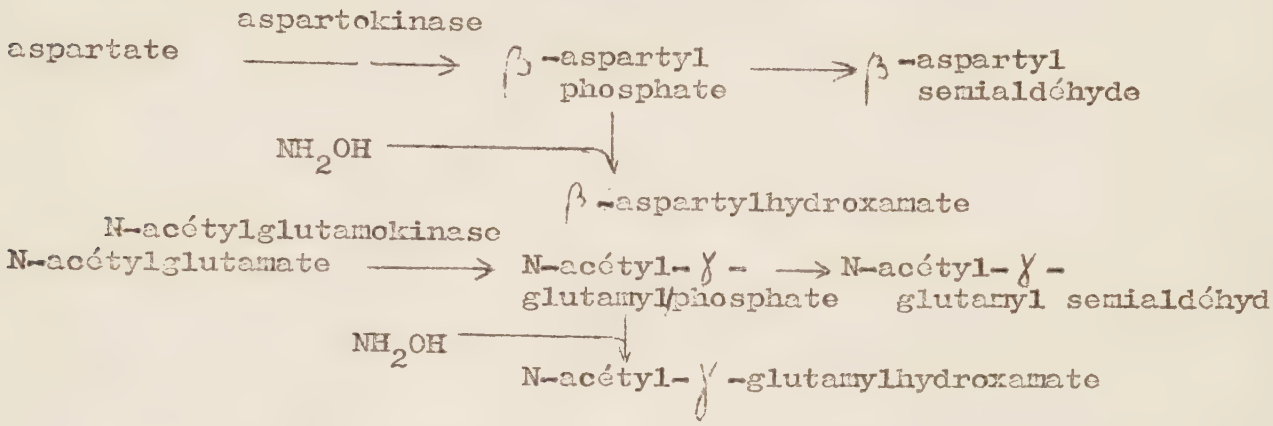
Un tel mutant ressemble, par son comportement, à une souche de N. crassa qui exige soit l'ornithine, l'arginine ou la proline et qui croît également sur milieu minimum avec des temps de latence et de génération très longs (28). Ce mutant doit donc présenter des caractéristiques analogues à celles de la souche de N. crassa étudiée par DAVIS et MORA (45,32)

B - NATURE DE LA MUTATION : ETUDE DE L'ACTIVITE DE PHOSPHORYLATION DU GLUTAMATE

Les résultats précédents suggérant une déficience au niveau de la première étape de biosynthèse de la proline, il reste à contrôler et préciser cette déduction par une étude enzymologique.

Nous avons émis l'hypothèse que la première étape de biosynthèse de la proline chez S. cerevisiae : glutamate $\longrightarrow$ γ-glutamyl semialdéhyde pouvait être une phosphorylation analogue à celle mise en évidence par BAICH chez E. coli (3). Cet auteur a montré l'existence d'une enzyme phosphorylant le glutamate : en présence d'hydroxylamine, il se forme du γ-glutamylhydroxamate.

Des réactions analogues se produisent dans la réduction de l'aspartate ou du N-acétylglutamate chez E. coli, comme chez S. cerevisiae.



Nous avons étudié la formation de γ-glutamyl phosphate chez le mutant pro. et la souche sauvage, cultivés dans les mêmes conditions.

1. <u>Recherche de la concentration optimum en proline pour la croissance du mutant sur milieu 2 (Fig. 25)</u>

Une bonne croissance du mutant est obtenue, en présence de $(NH_4)_2SO_4$, lorsque la quantité de proline ajoutée est importante par rapport à celle de $(NH_4)_2SO_4$.
Ceci est en accord avec le fait que la pénétration de la proline dans la cellule ne se fait de façon importante qu'après épuisement de $(NH_4)_2SO_4$. (13)

2. <u>Evolution de l'activité de phosphorylation du glutamate au cours de la croissance : (Fig. 26 à 30)</u>

L'activité enzymatique a été mesurée à différents stades de la croissance des 2 souches, cultivées sur différents milieux, dans les conditions décrites précédemment.

Il s'agit de savoir si le γ-glutamyl phosphate intervenant dans la biosynthèse de la proline est produit par la glutamine synthétase ou par une enzyme spécifique : la glutamokinase.

Dans le cas d'une culture sur $(NH_4)_2SO_4$ +proline, l'activité spécifique mesurée est beaucoup plus faible chez le mutant que chez le sauvage et la courbe représentant la variation de cette activité au cours de la croissance est totalement différentes pour les 2 souches. ../..

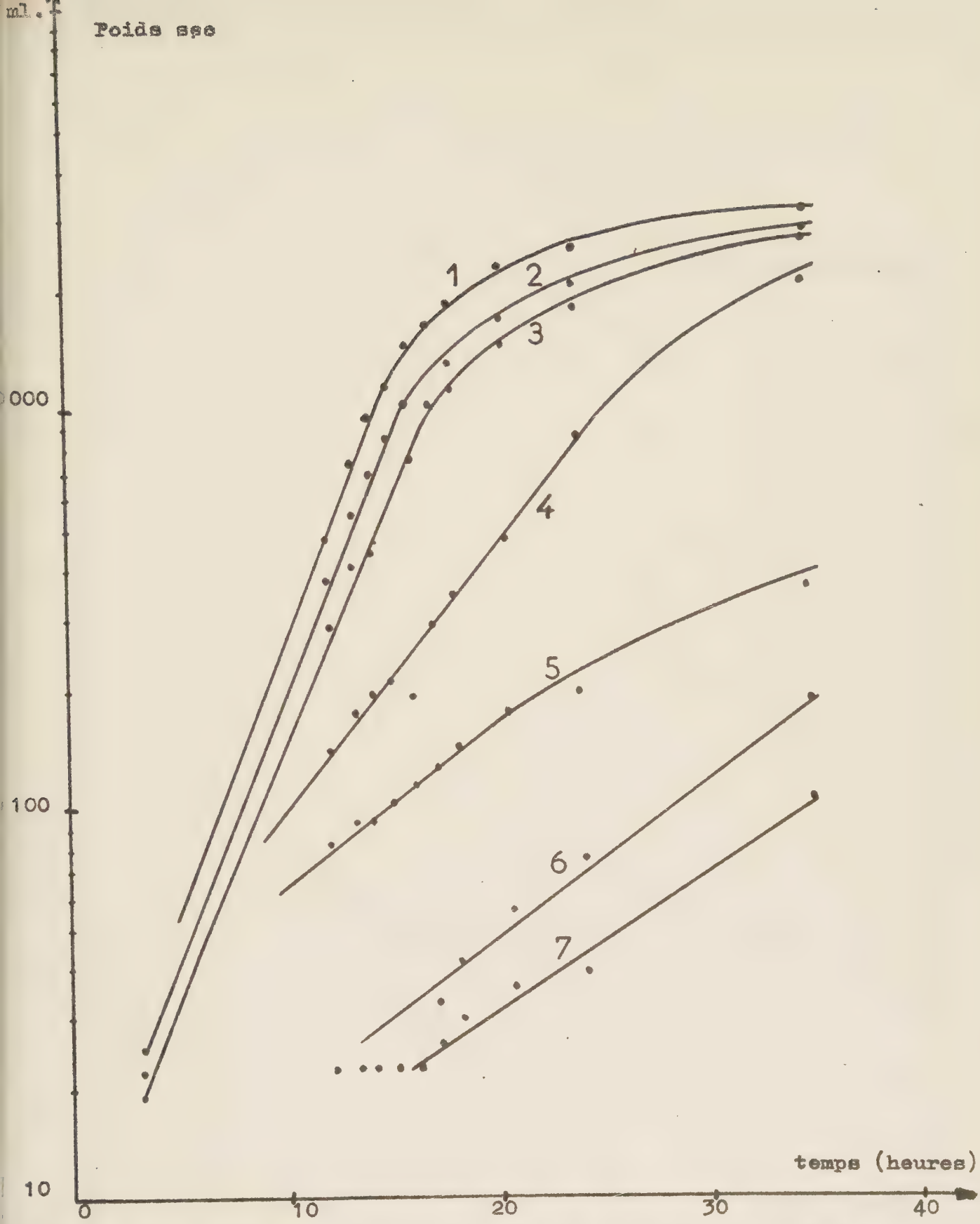


Figure 25 : Croissance du mutant proline⁻ sur milieu 2, composé de $(NH_4)_2SO_4$ + des quantités variables de proline.

Courbe	1	2	3	4	5	6	7
$(NH_4)_2SO_4$	10^{-2}M	5.10^{-3}M	10^{-2}M	10^{-2}M	10^{-2}M	10^{-2}M	10^{-2}M
proline	10^{-2}M	10^{-2}M	5.10^{-3}M	$2,5.10^{-3}$	$1,5.10^{-3}$	10^{-3}M	5.10^{-4}M.

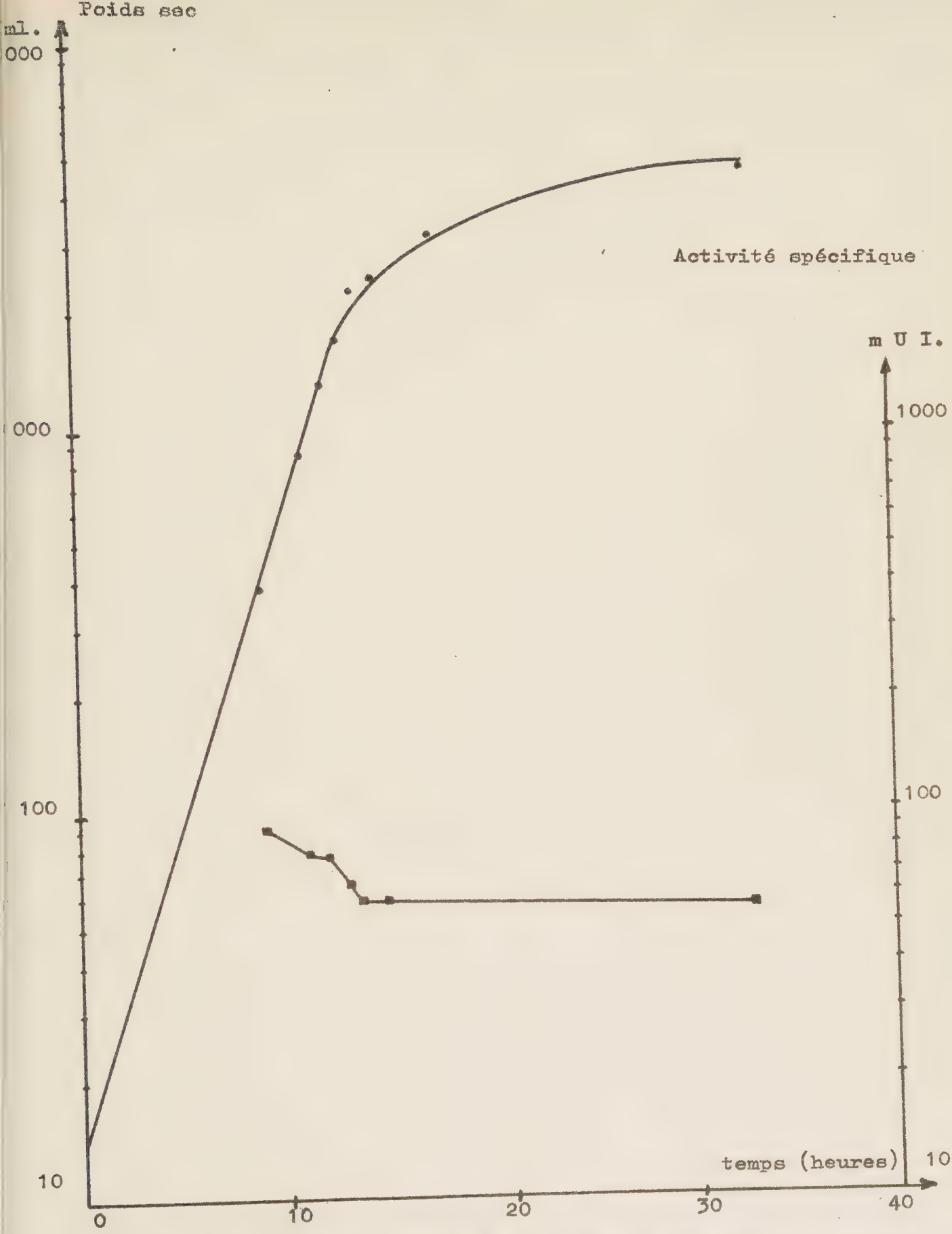


Figure 26 : Evolution de l'activité de synthèse de γ-glutamyl phosphate au cours de la croissance. —■—
Souche sauvage cultiviée sur $(NH_4)_2SO_4$ 10^{-2} M.

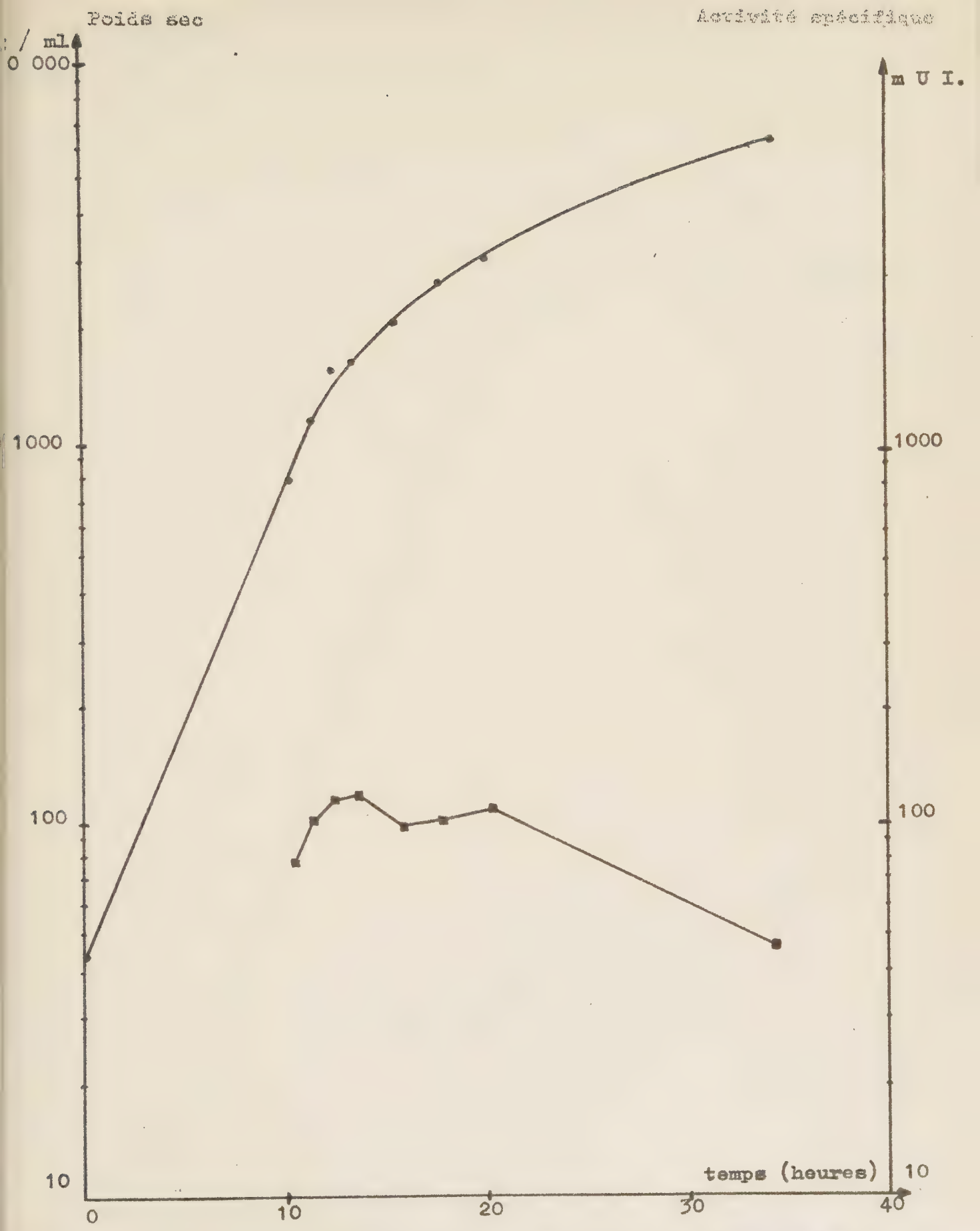


Figure 27 : Evolution de l'activité de synthèse du γ-glutamyl phosphate au cours de la croissance. —■—

Souche sauvage cultivée sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-3} M. + proline 10^{-2} M.

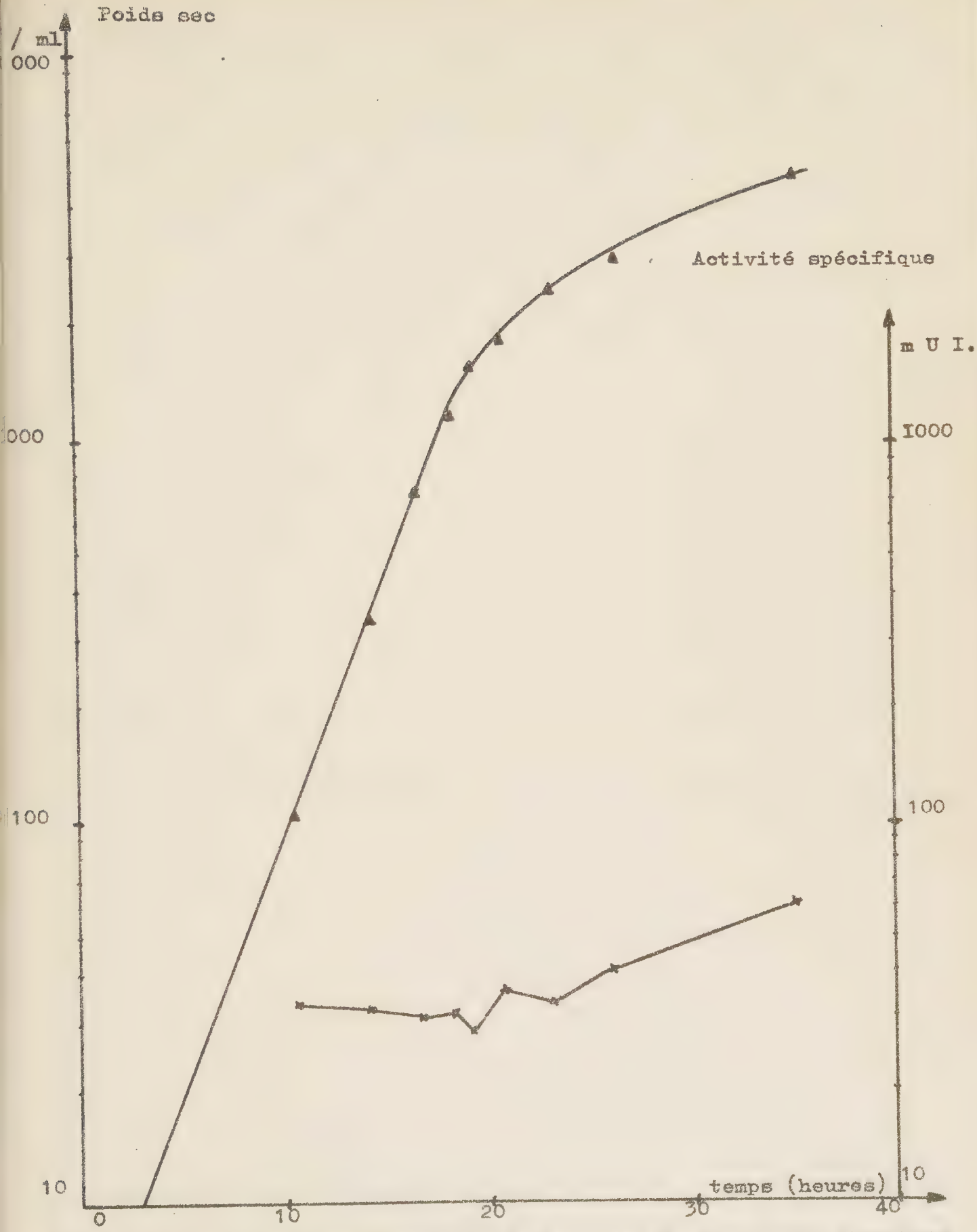


Figure 28 : Evolution de l'activité de synthèse du γ-glutamyl phosphate au cours de la croissance. —x—

Mutant proline⁻ cultivé sur $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-3} M + proline 10^{-2} M

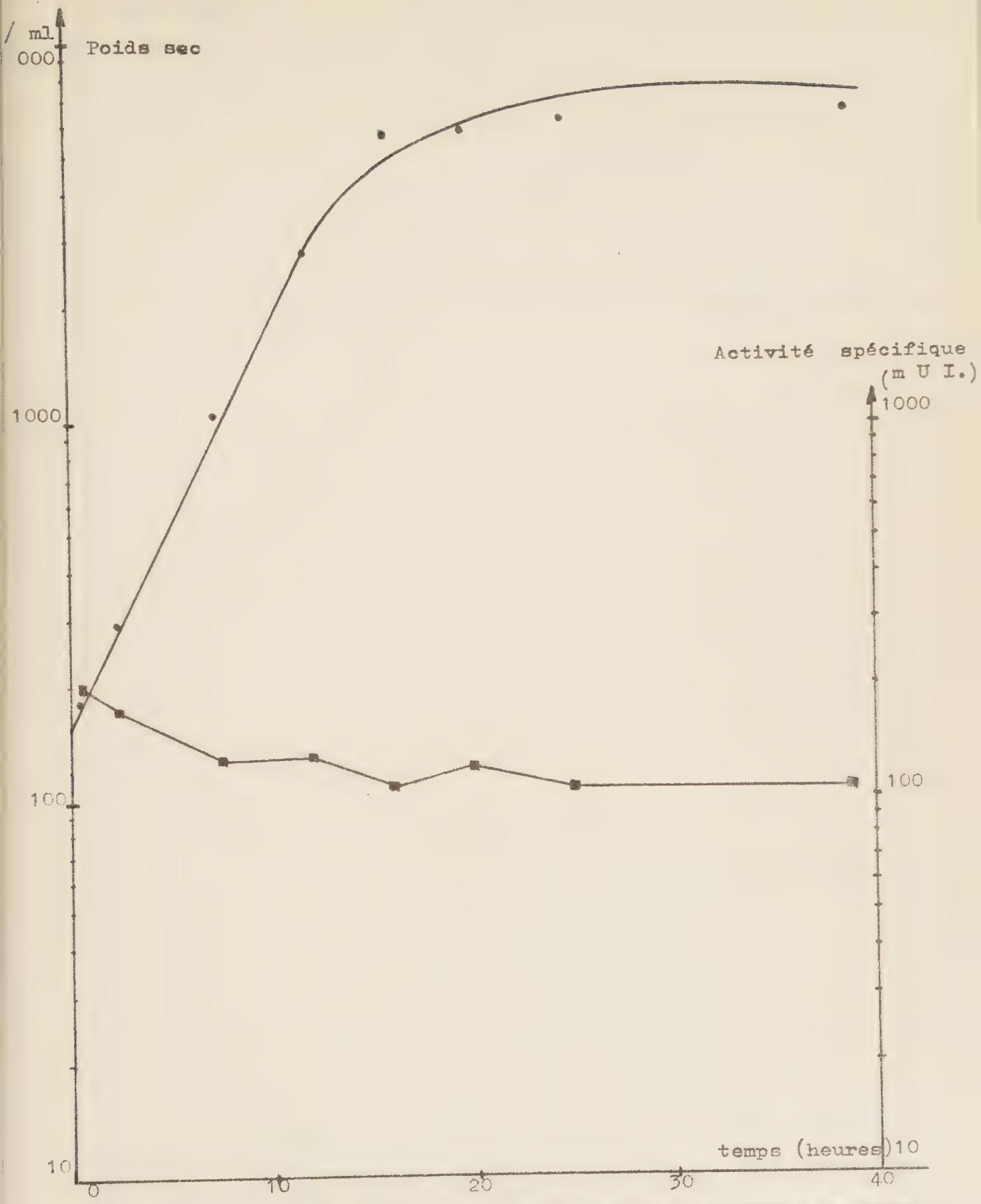


Figure 29 : Evolution de la synthèse du γ-glutamyl phosphate au cours de la croissance. —■—

Souche sauvage cultivée sur proline 2. 10^{-2} M.

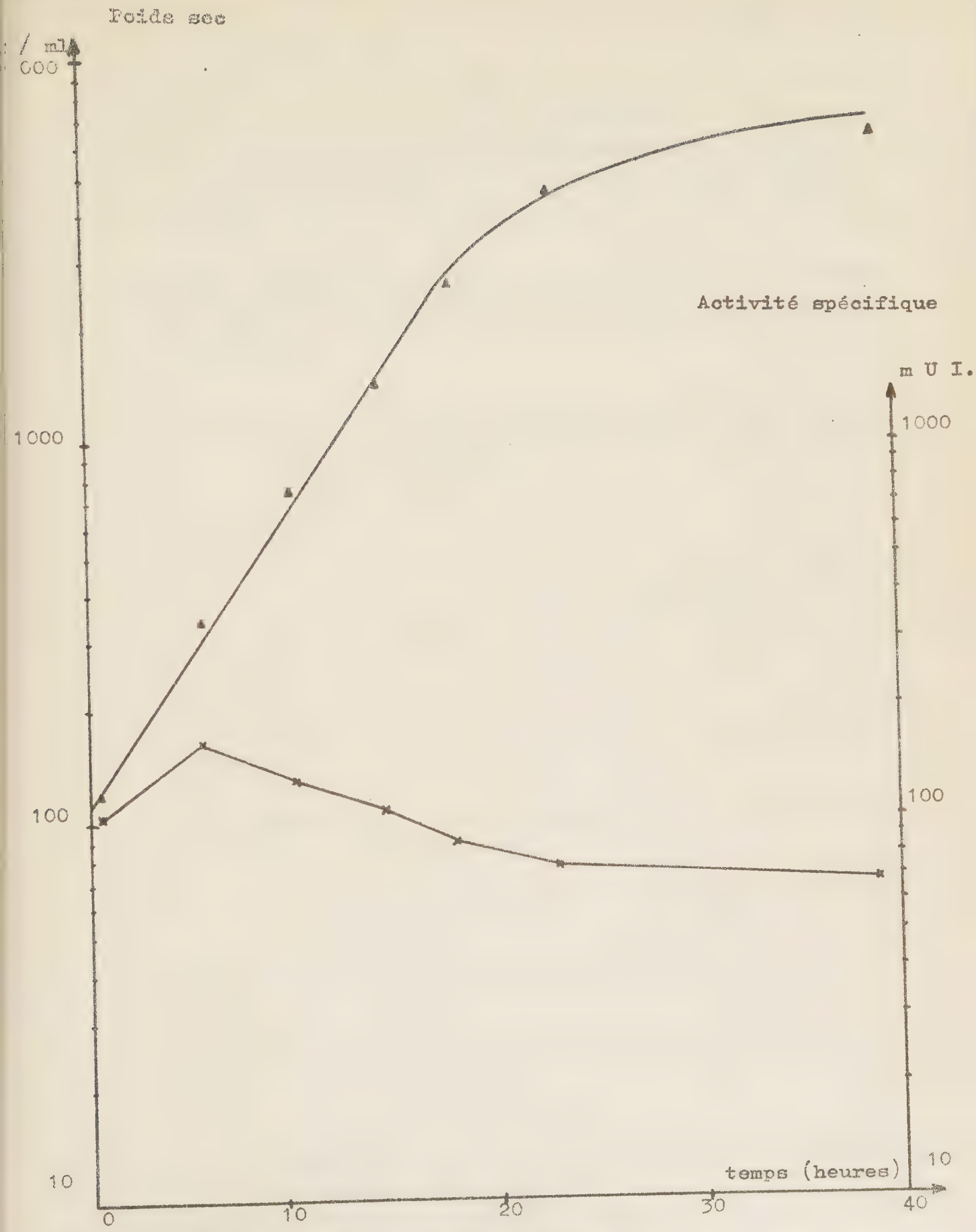


Figure 30 : Evolution de l'activité de synthèse du γ-glutamyl phosphate au cours de la croissance. —×—

Mutant proline⁻ cultivé sur proline 2.10^{-2}M.

Dans le cas d'une culture sur proline, au contraire, les activités ont pratiquement la même valeur et évoluent de la même manière au cours de la croissance, chez les deux souches.

Ces faits montrent que l'équipement enzymatique des deux souches pour la transformation envisagée est différent.

3 - Etude comparée des activités de synthèse et de transfert de γ-glutamyl phosphate et de leur évolution pendant la croissance.

a) Activités de transfert et de synthèse, pendant la phase exponentielle, sur $(NH_4)_2SO_4$+proline, au même stade de croissance.

1ère expérience.

	Activité de transfert (mUI)	Synthèse de γ-glutamyl phosphate (mUI)
Mutant	40,3	34,5
Sauvage	38	94,8

2ème expérience. Extraits enzymatiques filtrés sur Sephadex G 25 fine.

	Activité de transfert (mUI)	Synthèse de γ-glutamyl phosphate (mUI)
Mutant	15,5	23,6
Sauvage	17,6	64

b) Evolution de ces activités au cours d'une croissance sur proline (Fig. 30 bis)

L'évolution du rapport $\frac{\text{activité de synthèse}}{\text{activité de transfert}} = \frac{S}{T}$ est semblable chez le mutant et le sauvage, de même que l'évolution des activités de synthèse et de transfert.

../..

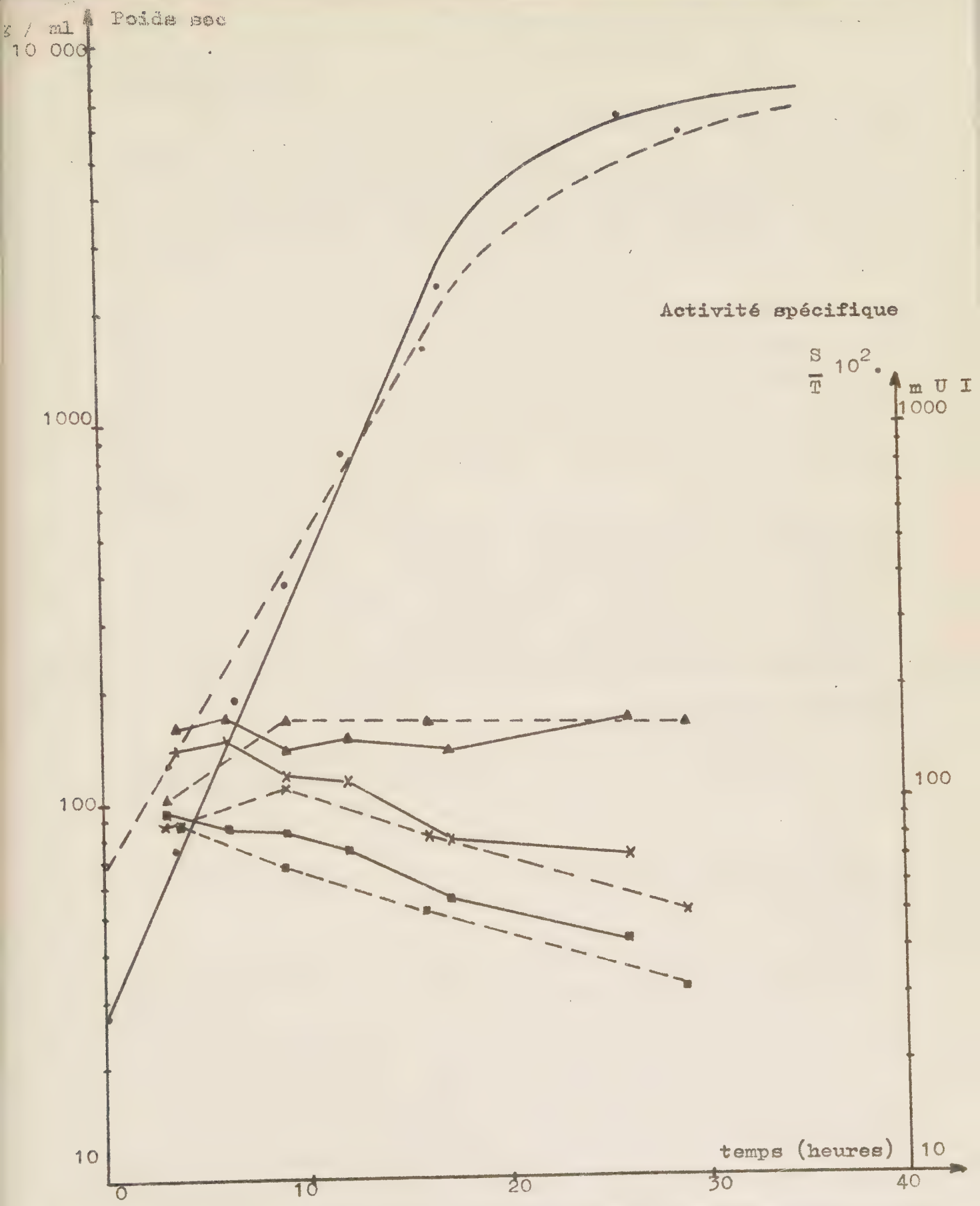


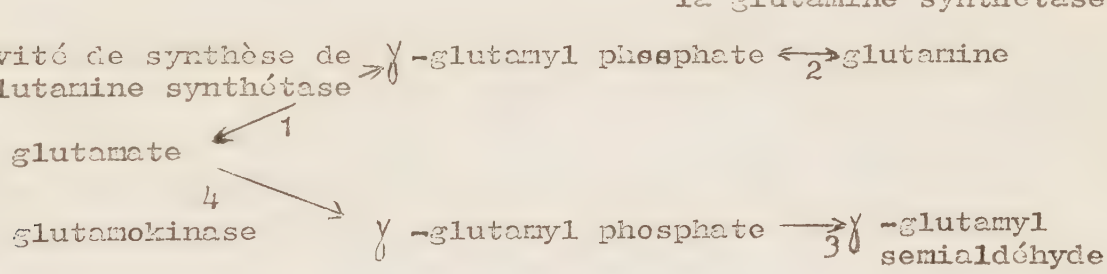
Figure 30 bis: Evolutions comparées des activités de synthèse du γ-glutamyl phosphate —X—, de transfert de la glutamine synthétase —■—, et du rapport $\frac{S}{T}$ = $\frac{\text{activité de synthèse}}{\text{activité de transfert}}$ —▲—, chez la souche sauvage et le mutant proline⁻, cultivés sur proline 2.10^{-2}M.

4 - Discussion.

Dans tous les cas, mutant et sauvage présentent une même activité de transfert. En revanche, comme cela a été observé précédemment, les activités de synthèse, identiques dans une culture sur proline, sont différentes sur $(NH_4)_2SO_4$ + proline. Le mutant manifeste alors une activité inférieure à celle du sauvage.

Ces faits sont en accord avec notre hypothèse : puisque les activités de transfert du sauvage et du mutant sont identiques dans toutes les conditions, il est logique d'admettre que la glutamine synthétase du mutant n'est pas affectée et que la différence d'activité de synthèse observée en culture sur $(NH_4)_2SO_4$ + proline s'explique par une déficience en une autre enzyme : la glutamokinase.

L'évolution de l'activité enzymatique du sauvage et du mutant sur $(NH_4)_2SO_4$ + proline montre que l'équipement enzymatique des deux souches est différent, ce qui suggère l'interprétation suivante : deux enzymes seraient mises en cause dans la transformation du glutamate en γ-glutamyl phosphate selon le schéma ci-dessous :



L'activité de synthèse mesurée serait alors la somme des deux activités glutamine synthétase et glutamokinase, comme chez E. coli (3,4) pour lequel il a été démontré que le γ-glutamyl phosphate joue le rôle d'intermédiaire commun à la biosynthèse de la glutamine et de la proline.

Une mutation au niveau du gêne correspondant à l'enzyme 4 rendrait bien compte des faits observés : à savoir une exigence pour la proline, non pour la glutamine et une activité totale des enzymes 1 et 4 plus faible que chez la souche sauvage.

../..

Mais l'étude de l'évolution de l'activité enzymatique sur proline complique l'interprétation. Elle fait apparaître :
1 - que les courbes d'évolution de l'activité de synthèse du sauvage et du mutant sont pratiquement superposables
2 - que le niveau d'activité est peu différent de celui mesuré sur ces mêmes souches, cultivées sur $(NH_4)_2SO_4$+ proline.
Il est possible d'avancer l'explication suivante :
1 - la proline réprime la glutamokinase et l'activité mesurée est celle de la glutamine synthétase, identique chez le mutant et le sauvage. Cette répression n'est pas aussi intense en culture sur $(NH_4)_2SO_4$ + proline que sur proline ; en effet la proline pénètre mal dans les cellules en présence des ions NH_4^+ : nous avons constaté que le mutant proline$^-$ n'a un taux de croissance normal qu'à partir de la concentration 5 mM de proline pour 10 mM de $(NH_4)_2SO_4$ (Fig. 25)
Il est d'ailleurs remarquable que les deux courbes obtenues avec les cultures sur $(NH_4)_2SO_4$+ proline se rejoignent après la phase exponentielle (Fig. 27,28)
2 - Il reste à expliquer que le niveau de la somme des activités des deux enzymes soit peu différent en culture sur proline et en culture sur $(NH_4)_2SO_4$+ proline, alors que dans le premier cas la glutamokinase est supposée réprimée, ce qui est apparemment en contradiction avec ce qui précède. Ici intervient un autre fait connu : la répression partielle de la glutamine synthétase par NH_4^+, phénomène mis en évidence par HOLZER (18).

Du fait de l'impossibilité de distinguer les activités des deux enzymes, cette explication en accord avec tous les faits connus reste hypothètique. Néanmoins les faits suivants sont bien établis :
- les équipements enzymatiques des deux souches relativement à la transformation envisagée sont différents et l'auxotrophie du mutant à l'égard de la proline est en relation avec une baisse de l'activité de phosphorylation du glutamate, qui ne se manifeste que dans certaines conditions.

../..

- puisque le mutant ne nécessite pas la glutamine pour sa croissance, il possède la glutamine synthétase, seule enzyme mise en cause dans sa voie de biosynthèse.

La glutamine synthétase ne relâche pas son γ-glutamyl phosphate qui reste attaché à l'enzyme. Sinon, le mutant proline$^-$ n'existerait pas.

C . ESSAIS DE CONFIRMATION DE L'EXISTENCE D'UNE GLUTAMOKINASE SPECIFIQUE DE LA PROLINE PAR DES ETUDES ENZYMOLOGIQUES.

1. Essai de rétroinhibition par la proline

La glutamokinase mise en évidence par BAICH chez E. Coli (3) est rétroinhibée par la proline, contrairement à la glutamine synthétase. Les essais de STRECKER (20) semblent indiquer qu'un traitement de congélation sur des cellules entières a pour effet une désensibilisation de l'enzyme pour la proline.

Nous avons essayé de distinguer la glutamokinase et la glutamine synthétase de la levure sauvage par une méthode analogue : nous avons dosé le γ-glutamyl phosphate formé en présence et en l'absence de proline 5. 10^{-2}M

La souche sauvage est cultivée sur $(NH_4)_2SO_4 \cdot 10^{-2}$M, le prélèvement a lieu en phase exponentielle (920 μg/ml)

	mUI
Témoin sans glutamate	0
proline	7,6
glutamate	86,9
glutamate+proline	90

Le même essai a été effectué sur des extraits des souches mutante et sauvage, cultivées sur $(NH_4)_2SO_4$+ proline, avant et après passage sur Sephadex G-25 fine

	Souche sauvage Prélèvement ; 1450 µg/ml avant passage sur Sephadex	après passage sur Sephadex	Souche mutante Prélèvement : 1530 µg/ml avant passage sur Sephadex	après passage sur Sephadex
Témoin sans glutamate	0	0	0	0
Glutamate	80	64	34,5	23,6
Glutamate + proline	97,2	65	34,5	25,1
proline	3,3	1,6	0	0

Il nous a donc été impossible de mettre en évidence une inhibition de la formation de γ-glutamyl hydroxamate par la proline chez les deux souches étudiées.

2 - Détermination de Km (Fig. 31.32)

Nous avons pensé que les enzymes des deux souches pouvaient avoir des affinités différentes pour le glutamate.
Dans une 1ère expérience, les Km déterminés par l'équation de la droite de régression sont $8,4.10^{-3}$ M chez le sauvage et $6,7.10^{-3}$ M chez le mutant.
Dans une seconde expérience, nous avons utilisé des concentrations élevées de glutamate (jusqu'à 400 µ M/ml). Les Km calculés par l'équation de la droite de régression sont respectivement de $8,7.10^{-3}$ M et $8,7.10^{-3}$ M pour le sauvage et le mutant.

Dans les deux cas, il apparaît que chez le mutant la représentation $1/v = f(1/S)$ est parfaitement linéaire alors que chez le sauvage cette représentation présente une légère courbure ; pour des concentrations élevées de glutamate on observe d'autre part une inhibition par excès de substrat seulement chez la souche sauvage.

../..

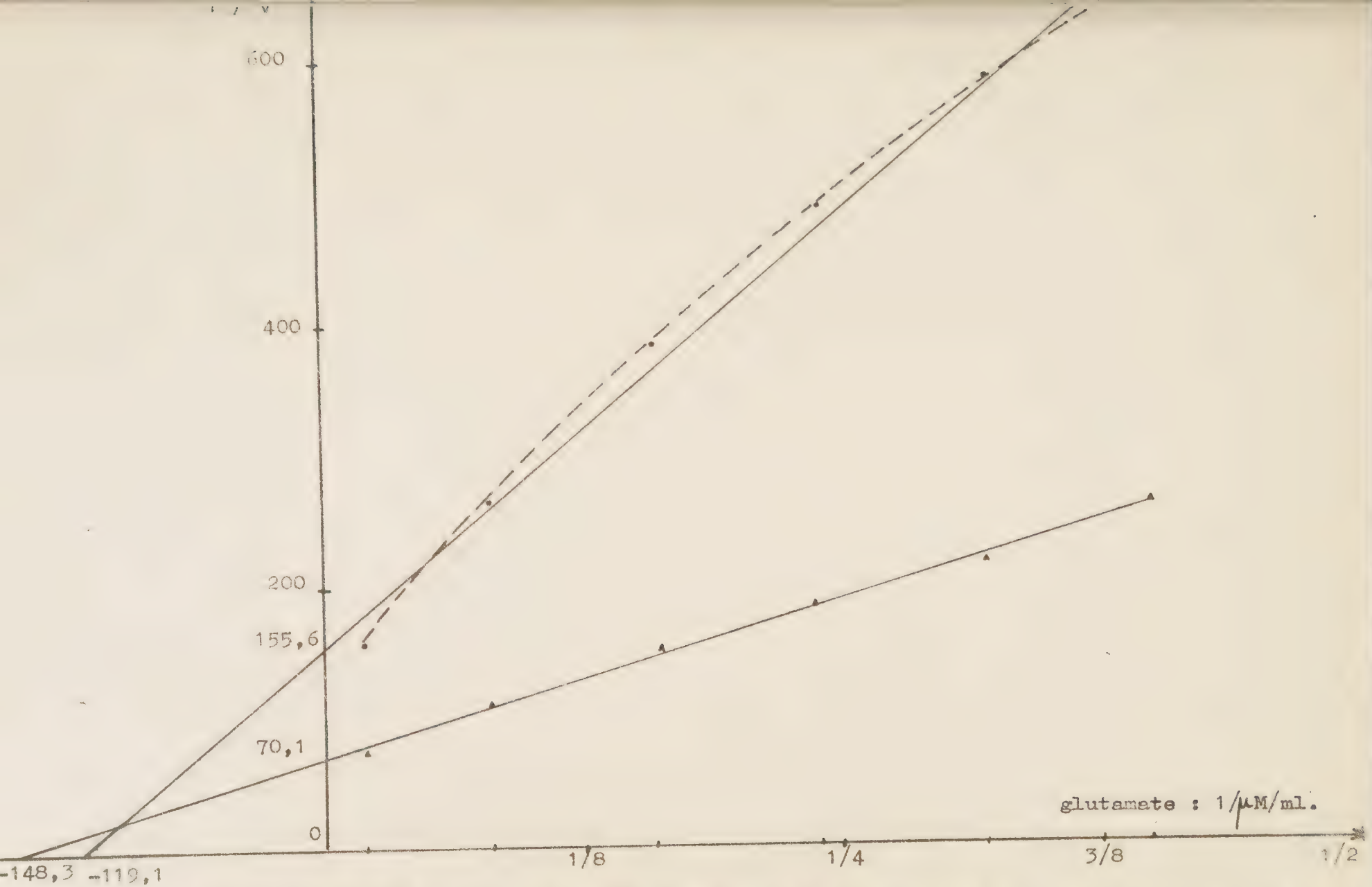


Figure 31 : Détermination du K_m pour le glutamate, d'extraits enzymatiques du mutant proline⁻ : —▲— ; et de la souche sauvage : —●— , pour des concentrations en glutamate inférieures à 50 µM/ml. $K_m = 8,46.\ 10^{-3}$ M pour le sauvage et $6,74.10^{-3}$ M pour le mutant.

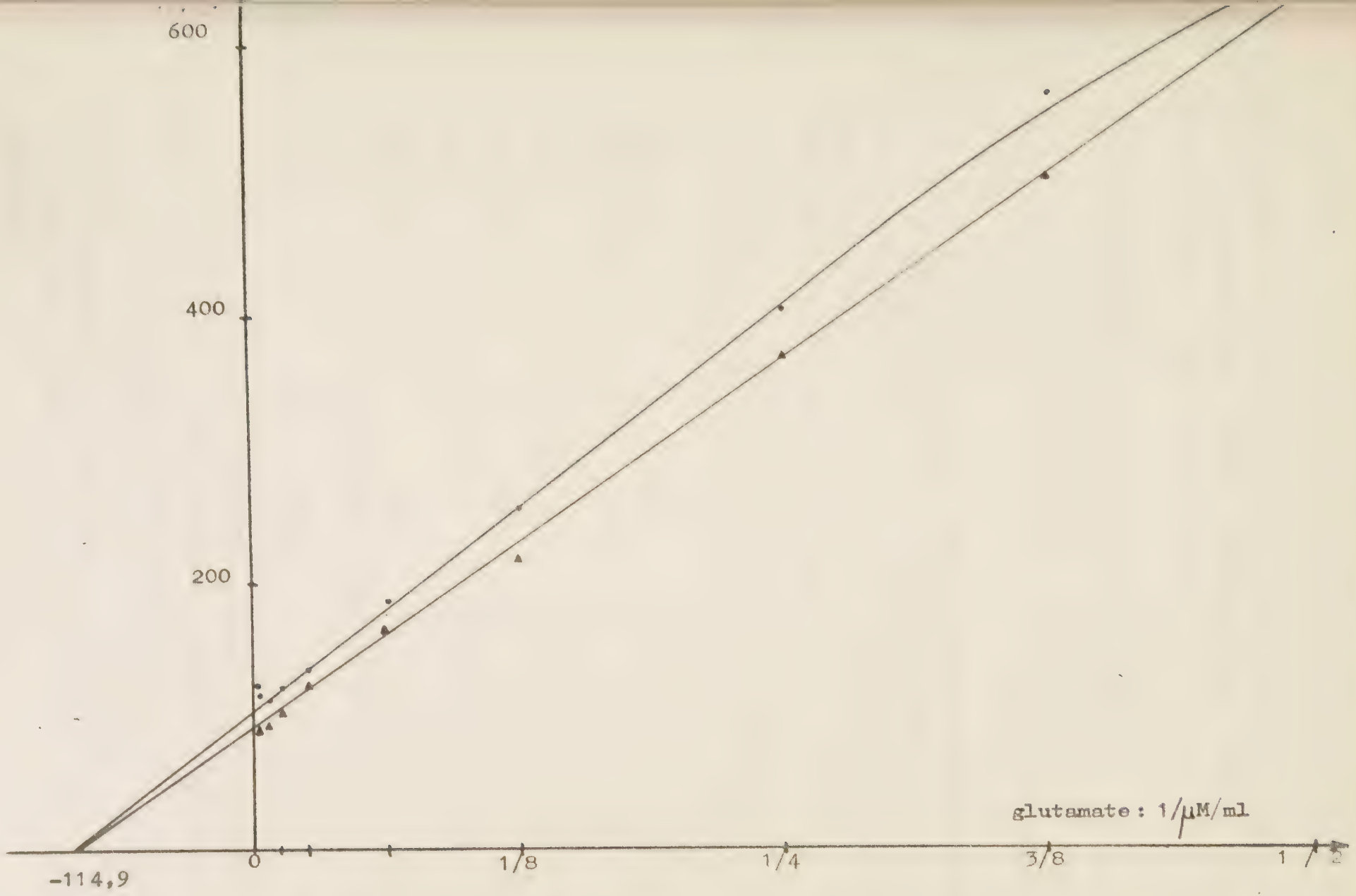


Figure 32 : Détermination du K_m pour le glutamate, d'extraits enzymatiques du mutant proline$^-$: —▲— et de la souche sauvage : —●— , pour de fortes concentrations en glutamate.
$K_m = 1/114,9 = 8,7\ 10^{-3}$ M.

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure de façon définitive à l'existence d'un système pluri-enzymatique chez le sauvage mais ils sont un argument de plus en faveur de notre hypothèse.

3 - Essais de dénaturation thermique (Fig. 33)

Si deux enzymes sont mises en cause dans la transformation du glutamate en γ-glutamyl phosphate, celles ci peuvent avoir des thermolabilités différentes donc des cinétiques de dénaturation thermique différentes.

a) recherche de la température provoquant une baisse de l'activité de 50 % en 10 mn de traitement.

Les extraits enzymatiques de la souche sauvage récoltée en fin de phase exponentielle sont filtrés sur un gel de Sephadex G-25 fine puis soumis au traitement thermique.

Pourcentage de l'activité initiale après un traitement de 10 minutes à différentes températures.

température (°C) / conditions de culture	50	52	55
$(NH_4)_2SO_4$	84,4	59,1	46
$(NH_4)_2SO_4$ + proline	86,8	62,6	47,4
proline	89,4	64,6	52,3

Nous avons choisi la température de 53°C, pour laquelle la baisse d'activité est 50 % après 10 minutes de traitement.

b) cinétique de dénaturation thermique

L'examen de la figure 33 nous indique que dans des conditions de culture identiques, les cinétiques de dénaturation thermique d'extraits enzymatiques du mutant et du sauvage sont pratiquement identiques.

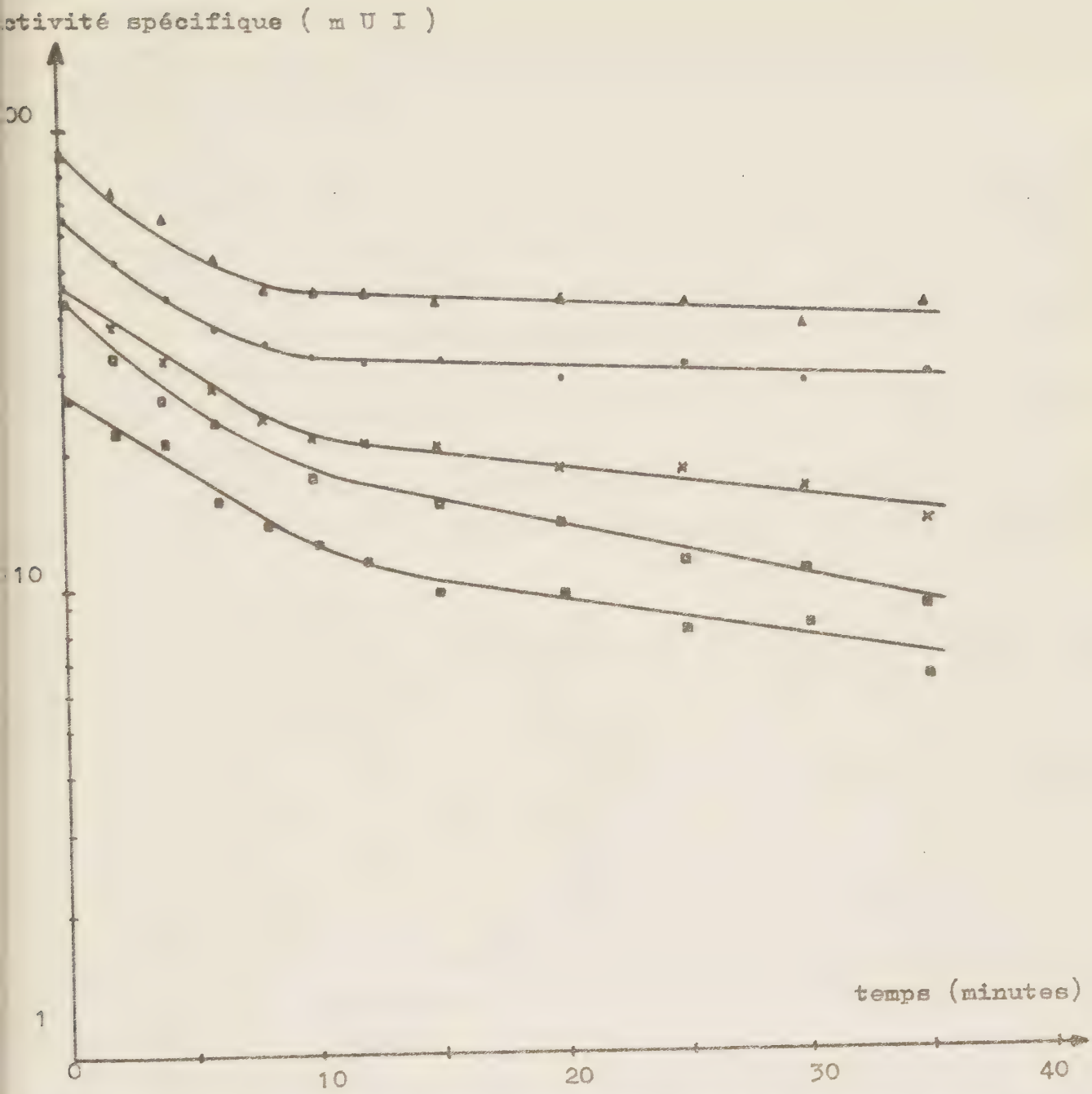


Figure 33 : Cinétique de dénaturation thermique à 53°C d'extraits enzymatiques de la souche sauvage cultivée sur $(NH_4)_2SO_4$: —□—, $(NH_4)_2SO_4$ + proline : —✕— , proline : —▲— et du mutant proline⁻ cultivé sur $(NH_4)_2SO_4$ + proline : —■— , proline : —●— .
Les extraits, filtrés sur Sephadex, proviennent de cultures en fin de phase exponentielle.

Avec des extraits de cellules cultivées sur proline ou $(NH_4)_2SO_4$ + proline, les cinétiques sont différentes, ce qui indique la nature différente des équipements enzymatiques dans ces deux types de cultures.

Dans tous les cas, les cinétiques sont d'ordre 2 ; le système est donc plurienzymatique. Pourtant, nous n'avons pu mettre en évidence une différence sensible entre les cinétiques de dénaturation thermique du mutant et du sauvage.

Dans le cas d'une culture sur proline, la deuxième pente est supprimée chez le mutant et le sauvage.
Cette deuxième pente correspondrait à la glutamokinase, réprimée dans une culture sur proline.

L'activité résiduelle résistante après une culture sur proline pourrait être dûe à une forme résistante de glutamine synthétase.

4 - Discussion

Les essais de confirmation de l'existence d'une enzyme phosphorylant le glutamate, différente de la glutamine synthétase n'ont pas fourni de résultats concluants.
Il nous est apparu que pour lever le doute que laissent subsister nos résultats, il était nécessaire d'obtenir un mutant totalement auxotrophe à l'égard de la proline.

Le persistance d'une faible croissance du mutant proline$^-$ sur milieu minimum peut s'expliquer de plusieurs manières :
1) la mutation n'a entraîné qu'une perte partielle d'activité d'une enzyme de phosphorylation du glutamate, propre à la voie de biosynthèse de la proline.
2) le γ-glutamyl phosphate résultant de l'activité résiduelle du mutant, que nous attribuons à la glutamine synthétase est utilisable pour la biosynthèse de la proline. Cette hypothèse est peu probable puisque le γ-glutamyl phosphate reste lié à la glutamine synthétase.
3) une autre voie de biosynthèse de la proline explique cette croissance. En effet, il existe une possibilité d'interconversion de l'ornithine en proline, mettant en jeu l'ornithine transaminase.

Pour tester les trois hypothèses, nous avons essayé d'obtenir une souche ayant en plus de la mutation pro., la mutation ota. qui prive dette souche d'activité ornithine transaminase. Si

l'hypothèse 3 est valable, une telle souche doit être rigoureusement auxotrophe.

D . RECHERCHE D'UN MUTANT A DOUBLE DEFICIENCE proline⁻, ota.

Nous avons essayé d'introduire la mutation ota. dans le génôme de notre mutant proline⁻ par mutagénèse suivie d'une sélection à la nystatine. Tous les essais effectués ont conduit à un échec. Nous avons alors tenté d'obtenir une telle souche en utilisant les techniques d'hybridation.

1 - Production d'un mutant ota.

Nous avons recherché un mutant ota. à partir de notre souche sauvage en faisant une mutagénèse suivie d'une sélection à la nystatine. Le milieu de sélection contenait l'ornithine comme seule source d'azote ; un tel milieu ne doit pas permettre la croissance d'un mutant ota.

Deux mutants déficients quant à l'ornithine transaminase ont été obtenus (activité de cette enzyme = 0,1 m UI contre 21 m UI chez le sauvage en phase post exponentielle). Nous n'avons trouvé trace de tels mutants chez S. cerevisiae que dans la thèse récente de P.THURIAUX (66) ; le Yeast Genetics Bulletin (65) ne mentionne pas leur existence.
De tels mutants ne poussent pas sur ornithine comme seule source d'azote, mais ont une croissance normale sur $(NH_4)_2SO_4$: ils sont donc prototrophes et l'ornithine transaminase de la levure a uniquement un rôle catabolique, comme chez N. crassa.

2 - Hybridations

Nous avons utilisé la technique d'obtention de souches isogèniques décrite précédemment.

Les souches proline⁻01-21 (a) et ota. (α) sont soumises au traitement mutagène puis hybridées.

../..

Dans ce cas, il n'est pas possible de faire directement un étalement sur milieu minimum car la souche ota. est prototrophe. Nous avons intercalé une phase de croissance sur milieu 2, contenant l'ornithine comme seule source d'azote, entre le croisement et les étalements, de façon à enrichir la population en cellules diploïdes.

Nous avons estimé la proportion de cellules diploïdes à 50 pour 10^6 haploïdes, au cours d'une expérience préliminaire. Nous avons donc une population composée de 1 cellule diploïde pour 10^4 mutants ota. 13 générations de phase exponentielle nous permettent d'obtenir l'égalité entre les populations diploïde et de mutants ota. Un inoculum de 2.10^4C/ml permet d'obtenir une population de 10^8C/ml au bout de 24 h., composée de 10^8C/ml de mutants pro. et 10^4C/ml de diploïdes.

Nous avons ensuite étalé 10^6C sur milieu minimum, qui ne permet pas une bonne croissance des mutants pro. De ces 10^6C sont apparues 100 colonies qui proviennent soit de cellules diploïdes, soit de mutants ota.

Les colonies donnant un bon résultat au test de sporulation sont soumises au traitement d'isolement des spores en masse.

Presque toutes les souches isolées dans la suite des manipulations étaient prototrophes.

2 souches ota (α) ont pourtant été isolées, nous avons alors pu les hybrider avec le mutant pro.01-21. De ces hybridations, nous avons pu isoler un certain nombre de souches ne poussant pas sur milieu minimum.

3 - Etude d'une souche issue du croisement proxota : pro 09-15

a) croissance à partir d'un inoculum prélevé en phase exponentielle.

La préculture est réalisée sur un milieu contenant NH_4^+ + proline ; les cellules lavées sont transférées dans différents milieux.

De l'examen des courbes de croissance (Fig. 34), il apparaît que la souche obtenue croît très bien sur milieu minimum supplémenté en arginine, ornithine ou proline. Sur milieu minimum ou supplémenté en glutamine, la croissance est d'abord normale puis présente une chute brutale du taux de croissance vers 60 µg/ml.

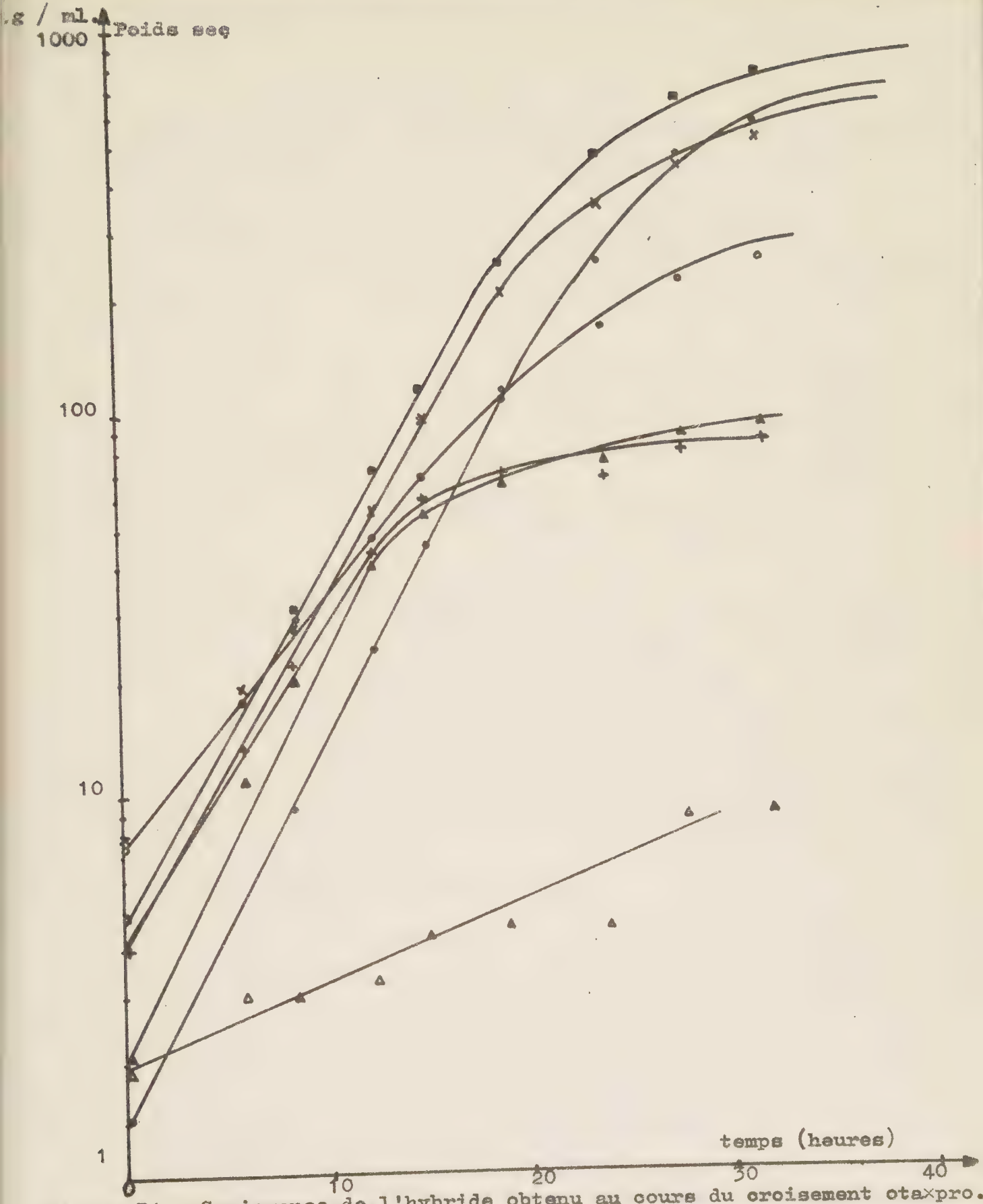


Figure 34 : Croissance de l'hybride obtenu au cours du croisement ota×pro.
Inoculum prélevé en phase exponentielle.
Cultures sur : $(NH_4)_2SO_4$ 10^{-3}M —▲— ; $(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4}M + proline 10^{-3}M —●— , arginine 3.10^{-4}M —■— , ornithine 5.10^{-4}M —✕— , glu-

Sur milieu supplémenté en glutamate, la croissance est pratiquement arrêtée. L'ornithine, seule source d'azote permet une assez bonne croissance.

b) croissance à partir d'un inoculum privé d'azote.

La préculture sur milieu contenant NH_4^+ +proline est prolongée 48 h après la fin de la phase exponentielle afin d'épuiser les réserves en acides aminés.

L'examen des courbes (Fig. 35) fait apparaître une bonne croissance de la souche sur milieu minimum supplémenté en arginine, ornithine ou proline. La croissance sur milieu minimum ou supplémenté en glutamine ne correspond qu'à une multiplication très faible du poids sec de l'inoculum. Sur un milieu supplémenté en glutamate, la croissance est pratiquement stoppée.

4 - Dosage du γ-glutamyl phosphate

Nous avons dosé le γ-glutamyl phosphate sur un extrait enzymatique de la souche cultivée sur NH_4^+ + proline ; le prélèvement a lieu en phase exponentielle au stade de 549 μg/ml.

Dans ces conditions, l'activité spécifique de l'extrait est de 17,5 mUI ; celle-ci est nettement inférieure à celle de la souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions (61 mUI), légèrement inférieure à celle du mutant proline⁻ 01-21 (28 mUI).

5 - Cinétique de dénaturation thermique

La figure 36 nous montre que les cinétiques de dénaturation thermique à 53°C d'extraits enzymatiques du mutant proline⁻09-15 sont identiques dans des cultures sur $(NH_4)_2SO_4$ + proline et proline, contrairement aux souches sauvages et proline⁻ initiale.

Ce résultat nous permet de conclure que les équipements enzymatiques du mutant proline⁻09-15 et de la souche sauvage sont différents dans une culture sur $(NH_4)_2SO_4$+proline mais identiques dans une culture sur proline, où la glutamokinase doit être totalement réprimée. La 2ème pente, probablement dûe à la glutamokinase, n'existe plus.

Nous retrouvons également la répression partielle de la glutamine synthétase (70 %) par NH_4^+, en accord avec HOLZER (18).

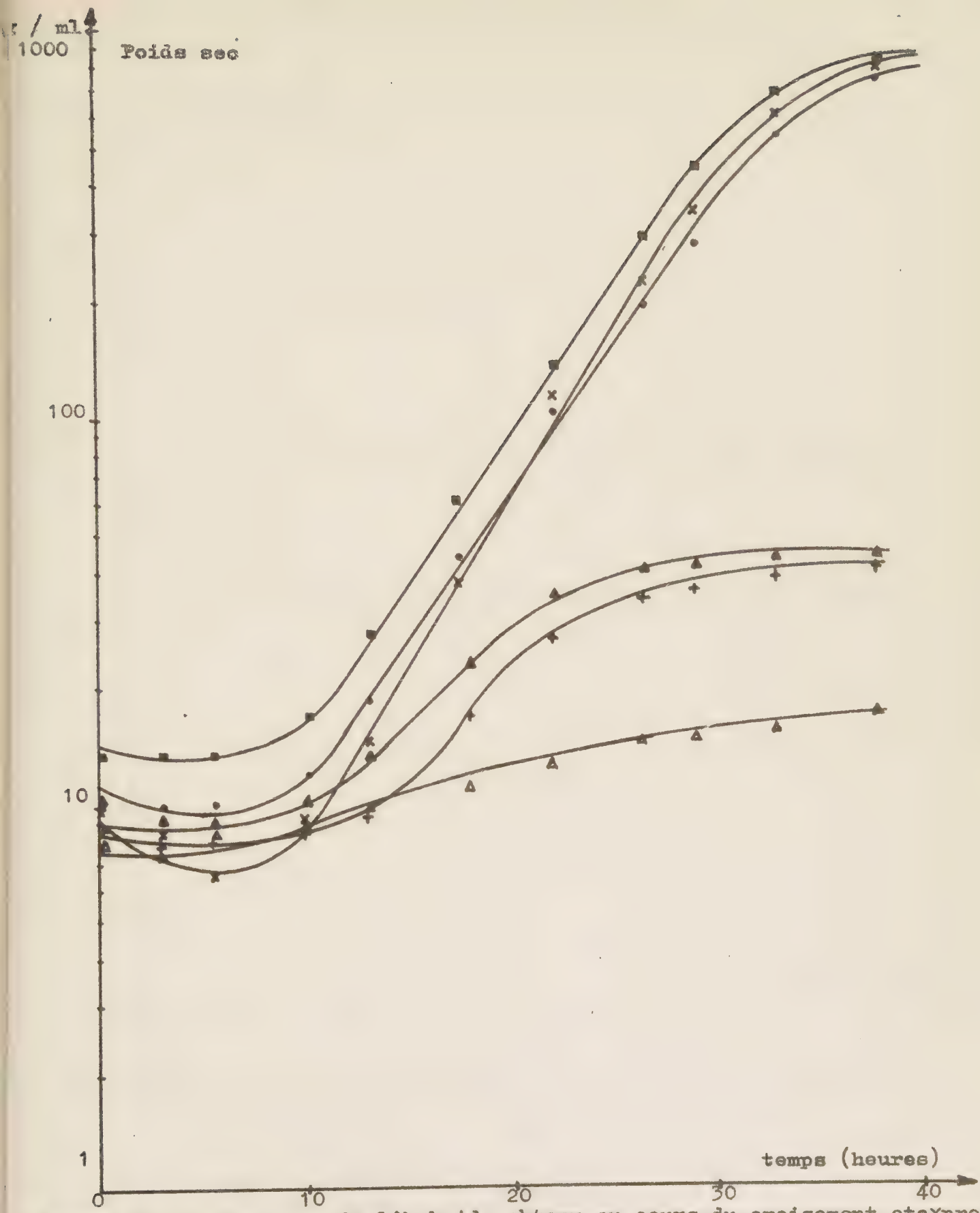


Figure 35 :Croissance de l'hybride obtenu au cours du croisement otaxpro. Inoculum prélevé après 48 h.de privation azotée.
Cultures sur : $(NH_4)_2SO_4$ 10^{-3}M —▲— .$(NH_4)_2SO_4$ 5.10^{-4}M + proline 10^{-3}M —●— ,arginine 3.10^{-4}M —■— ,ornithine 5.10^{-4}M —✕— ,glutamate 10^{-3}M —△— ,glutamine 5.10^{-4}M —+— ;ornithine 10^{-3}M

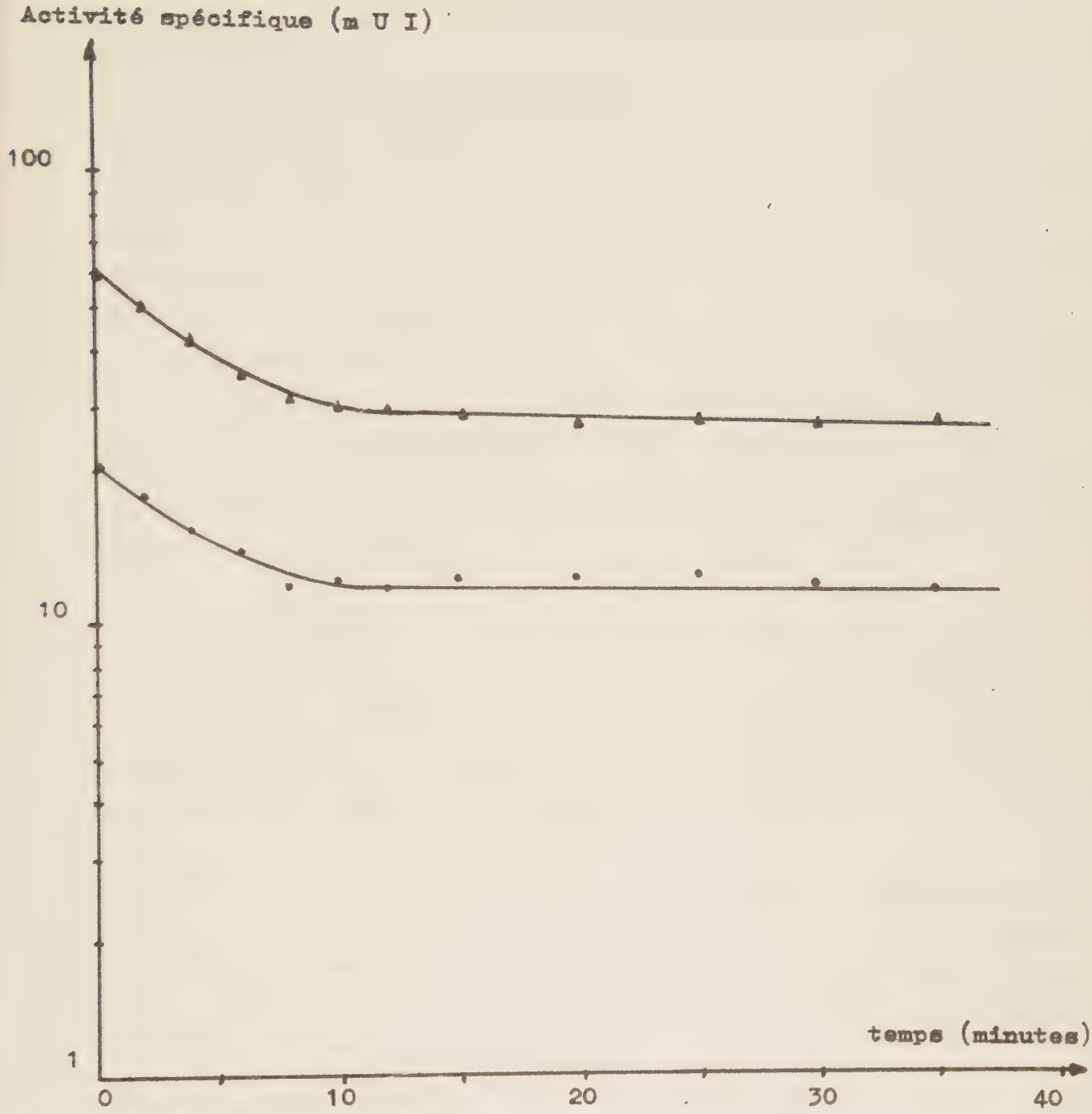


Figure 36 : Cinétique de dénaturation thermique à 53°C d'extraits enzymatiques du mutant proline 09 15 cultivé sur $(NH_4)_2SO_4$ + proline : —●— , proline : —▲—.
Les extraits, filtrés sur "Sephadex", proviennent de cultures en fin de phase exponentielle.

6 - Discussion

Les faits observés s'expliquent en admettant que le mutant proline⁻ initial cumule un gêne pro. entraînant une auxotrophie et un gêne "suppresseur" SUP. permettant une légère croissance sur milieu minimum. L'hybridation avec le mutant ota. a permis la ségrégation des deux gênes qui ne sont donc pas étroitement liés. D'ailleurs, le croisement d'une souche sauvage avec le mutant proline⁻ initial donne également des souches ayant même phénotype que le mutant proline⁻ 09-15. Une mutation du type SUP. se produit d'ailleurs souvent spontanément et permet une croissance lente des mutants auxotrophes sur milieu non supplémenté. Une mutation "suppresseur" est en général dominante ; ceci est en accord avec le fait que les diploïdes résultant du croisement proline⁻ initial x ota. poussent lentement sur milieu minimum.

Les cinétiques de dénaturation thermique, différentes chez le mutant proline⁻ 09-15 et chez la souche sauvage montrent que les équipements enzymatiques de ces deux souches sont différents pour la transformation du glutamate en γ-glutamyl phosphate. Le [illegible] a [illegible] perdu une enzyme phosphorylant le glutamate, et intervenant dans la biosynthèse de la proline.

Il reste à expliquer pourquoi nous n'avons pu obtenir d'hybrides pro. ota. En supposant que les gênes pro. et ota. ne soient pas liés, on devrait obtenir à la même fréquence des mutants pro. et pro. ota; le croisement de 2 souches PRO.ota.sup. et pro.OTA.SUP donnerait les produits suivants :

PRO	ota	sup	parents
pro	OTA	SUP	
PRO	OTA	sup	
PRO	OTA	SUP	
pro	ota	SUP	
pro	OTA	sup	____ souches obtenues
pro	ota	sup	____ souches recherchées
PRO	ota	SUP	

PRO, OTA, sup sont les allèles sauvages

../..

Un travail de DAVIS (32) nous suggère une explication : chez N. crassa, l'auteur n'a pu obtenir d'hybride arg 9.ota. (le gêne arg 9, comme le gêne arg 8, est responsable de la première étape de biosynthèse de la proline) car les gênes arg 9.et ota sont liés et très voisins. Il est possible qu'il en soit de même chez S. cerevisiae. Un échantillon plus important (10.000 colonies) devrait pourtant permettre l'obtention de recombinants pro. ota, même si les gênes sont au même locus.

D'autre part, le fait que les mutants pro. obtenus par hybridation ne poussent pas sur milieu minimum ou supplémenté en glutamate ou glutamine mais poussent aussi bien sur milieu supplémenté en arginine, ornithine ou proline montre que la voie de l'ornithine transaminase est capable de satisfaire les besoins de la cellule en proline.

C O N C L U S I O N

La proline peut être biosynthéthsée par 2 voies ne fonctionnant pas simultanément. La première voie passe par la réduction du glutamate en γ-glutamyl semialdéhyde, avec formation intermédiaire d'un dérivé phosphorylé : le γ-glutamyl phosphate. Cette voie est certainement prépondérante dans des cultures sur $(NH_4)_2 SO_4$. ou des milieux supplémentés en acide glutamique ou glutamine. Une seconde voie de biosynthèse est possible à partir de l'ornithine. Cette voie doit fonctionner dans des cellules cultivées sur milieu contenant de l'arginine ou de l'ornithine, dans ces conditions l'ornithine transaminase est induite, même en présence de NH_4^+ (64)

La croissance lente sur milieu minimum du mutant pro-01-21 déficient pour la phosphorylation du glutamate mais n'exigeant pas la glutamine indique que le γ-glutamyl phosphate synthétisé pour la biosynthèse de la glutamine n'est pas utilisable pour celle de la proline. Ceci n'est pas étonnant si l'on se rappelle que le γ-glutamyl phosphate formé par la glutamino synthètase n'est pas libéré et reste lié à celle-ci sauf en présence d'hydroxylamine ; d'ailleurs étant donné la haute réactivité du composé il est vraisemblable que celui formé par la glutamokinase n'est pas libéré non plus.

Mais le mutant pro.01-21 sur lequel a été effectuée cette étude s'est révélé lors d'une hybridation, plus complexe que nous ne l'avions pensé au départ,

Le second type de mutant pro. obtenu, :pro.09-15 s'est montré incapable de croître sur milieu minimum après épuisement des réserves en acides aminés. La croissance sur arginine, ornithine et NH_4^+ n'est pas dûe à la même cause puisque nous sommes parvenus à supprimer la croissance sur NH_4^+ en préservant celle sur arginine et ornithine. Ceci nous a amenés à supposer que le mutant objet de notre étude cumulait une mutation pro. entrainant une auxotrophie plus une mutation "suppresseur". La croissance du mutant pro.01-21 sur milieu minimum s'explique

../..

par le fait que sa déficience en glutamokinase n'est pas totale. Au contraire, le mutant pro.09-15, probablement déficient pour la glutamokinase ne pousse plus sur milieu minimum ou supplémenté en glutamate ou glutamine. Sa croissance sur milieu supplémenté en ornithine ou arginine est possible grâce à la voie de l'ornithine transaminase.

En résumé, les arguments en faveur de l'existence de deux enzymes distinctes phosphorylant le glutamate sont

1 - l'existence de mutants pro.09-15 et pro.01-21 pour une enzyme phosphorylant le glutamate, exigeant la proline mais pas la glutamine.
2 - la régulation distincte des activités de phosphorylation du glutamate chez la souche sauvage et le mutant proline$^-$01.21 : la glutamokinase est probablement réprimée par la proline et la glutamine synthétase par NH_4^+
3 - les cinétiques de dénaturation thermique différentes chez la souche sauvage et le mutant proline$^-$09.15 dans des conditions de culture identiques.

La preuve définitive de l'existence de deux enzymes distinctes serait le fractionnement qui permettrait de les séparer.

* * *

B I B L I O G R A P H I E

1- B. DUTEURTRE
Thèse de Docteur ingénieur-NANCY- mars 1970

2- A. BAICH. DJ. KERSON
Biochim. Biophys. Acta 104 (1965) 397-404

3- A. BAICH
Biochim. Biophys. Acta 192 (1969) 462-467

4- F. YOSHINAGA- Y. TAKEDA - S. OKUMURA
Biochem. Biophys. Res. Comm. 27 (1967) 143-149

5- AG. MOAT - F. AHMAD
Wall. Lab. Comm. 96 (1965) 111

6- A. MEISTER Acad. Press. Inc. NEW-YORK
The Enzymes Tome 6 (1962) 247-66

7- L. LEVINTOW - A. MEISTER
Fed. Proc. 15 (1956) 299

8- L. LEVINTOW - A. MEISTER
J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 303

9- L. LEVINTOW - A. MEISTER
J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 6042

10- PD. BOYER OJ. KOEPPE - WW. LUSHINGER
J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 356

11- JE. WARNER - DH. SLOCUM - GC. WEBSTER
Arch. Biochem. Biophys. 73 (1958) 508

12- A. MEISTER Acad. Press. Inc. New-York
The Enzymes Tome 6 (1962) 443-468

13- PR. KRISHNASWAMY - V. PAMILJANS - A. MEISTER
Fed. Proc. 19 (1960) 349

14- PR. KRISHNASWAMY - V. PAMILJANS - A. MEISTER
J. Biol. Chem. 235 (1960) PC 39

15- WH. ELLIOT
Biochem. J. 49 (1951) 106-112

16- ER. STADTMAN - CA. WOOLKOLK
Biochem. Biophys. Res. Comm. 17 (1964) 313

17- CA. WOOLFOLK - B. SHAPIRO - ER. STADTMAN
Arch. Biochem. Biophys. 116 (1966) 177-192

../..

18- G. KOHLHAW - W. DRAGERT - H. HOLZER
Biochem. Zeit. 341 (1965) 224-238

19- MJ. VOGEL - BD. DAVIS
J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) 109

20- HJ. STRECKER
J. Biol. Chem. 225 (1957) 825-834

21- S. BLACK - NG. WRIGHT
J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 5766

22- H. TRISTRAM - CF. THURSTON
Nature 212 (1966) 74-75

23- RH. DE. DECKEN
Biochem. Biophys. Res. Comm. 8 (1962) 462

24- A. BAICH
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39 (1970) 544-550

25- D. MECKE - H. HOLZER
Biochim. Biophys. Acta 122 (1966) 341

26- D. MECKE - K. WULFF - H. HOLZER
Biochim. Biophys. Acta 128 (1966) 559

27- F. LIPMANN - LC. TUTTLE
J. Biol. Chem. 159 (1945) 21

28- HJ. VOGEL - DM BONNER
Proc. Natl. Acad. Sci. 40 (1954) 688

29- PH. ABELSON - HJ. VOGEL
J. Biol. Chem. 213 (1955) 355

30- T. YURA - HJ. VOGEL
Biochim. Biophys. Acta 122 (1966) 341

31- ME. SMITH - DM. GREENBERG
J. Biol. Chem. 226 (1957) 317-327

32- RH. DAVIS
J. Bact. 96 (1968) 389-395

33- S. UDAKA - S. KINOSHITA
J. Gen. Appl. Microbiol. 4 (1958) 272

34- S. UDAKA - S. KINOSHITA
J. Gen. Appl. Microbiol. 4 (1958) 283

../..

35- A. DAISH -- HJ. VOGEL
Biochim. Biophys. Res. Comm. 7 (1962) 491

36- A. FARAGO - G. DENES
Biochim. Biophys. Acta 136 (1967) 6-18

37- AH. SRB - JRS. FINCHAM-D. BONNER
Am. J. Botany 37 (1950) 533

38- HJ. VOGEL
Proc. Natl. Acad. Sci. 39 (1953) 578

39- JRS. FINCHAM
Biochem. J. 53 (1953) 313-320

40- G. DE. HAUWER- R. LAVALLE - JM. WIAME
Biochim. Biophys. Acta 81 (1964) 257-269

41- EJ. LAISHLEY - RW. BERNLOHR
J. Bact. 96 (1968) 322-329

42- RN. COSTILOW - L. LAYCOCK
J. Bact. 100 (1969) 662-667

43- WJ. SCHER - HJ et JR. VOGEL
Proc. Natl Acad. Sci. 43 (1957) 796

44- DE.REED - LN. LUKENS
J. Biol. Chem. 241 (1966) 264-270

45- RH. DAVIS-J. MORA
J. Bact.96 (1968) 383-388

46- I. ANDERSON-KOTTO - G. EHRENSVARD
Hereditas 50 (1963) 1-52

47- LJ. WICKERHAM
US. Dep. Agri. Techn. Bull. (1951) 1029

48- R. SNOW
Nature 211 (1966) 206-207

49- R.R. FOWELL Acad. Press. Inc. New-York
The Yeasts vol 1 (1969) 362

50- JM. WIAME - R. STORCK
Biochim. Biophys. Acta 10 (1953) 268

51- D. THOUVENOT - C. BOURGEOIS
Ann. Inst. Past. (A paraître)

52- J. et EM. LEDERBERG
J. Bact. 63 (1952) 399-406

../..

53- DC. HAWTHORNE
Genetics 48 (1963) 1727

54- J. BECHET - M. GRENSON - JM. WIAME
Eur. J. Biochem. 12 (1970) 31-39

55- H. DE ROBICHON SZULMAJSTER - PT. MAGEE
Eur J. Biochem. 3 (1968) 492-501

56- AG. GORNWALL - CJ. BARDAWILL - MM. DAVID
J. Biol. Chem. 177 (1949) 751

57- MK. ZISHKA - JS. NISHIMURA
Anal. Biochem. 34 (1970) 291-297

58- M. PIOTROWSKA - M. SAWICKI - P. WEGLENSKI
J. Gen. Microbiol. 55 (1969) 301-305

59- AM. ALBRECHT - WI. SCHER - HJ. VOGEL
Anal. Chem. 34 (1962) 398

60- HJ. STRECKER
J. Biol. Chem. 235 (1960) 2045-2050

61- WJ. MIDDELHOVEN
Biochim. Biophys. Acta 93 (1964) 650-652

62- A. MEISTER
J. Biol. Chem. 206 (1954) 577-585

63- C.BOURGEOIS
Bull. Soc. Chim. Biol. 51 (1969) 935

64- C.BOURGEOIS - D. THOUVENOT
Eur. J. Biochem. 15 (1970) 140-145

65- RC. VON. BORSTEL
Yeast Genetics Supplement to Microbial Genetics Bulletin
Nov. 1969 n° 31

66- P. THURIAUX
Thèse Université Libre - BRUXELLES 1969

TABLE DES MATIERES

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

INTRODUCTION page 1

I - BIBLIOGRAPHIE " 2

A-BIOSYNTHESE DE LA GLUTAMINE

1-Formation de la glutamine

2-Formation de γ-glutamyl phosphate

3-Mise en évidence de la formation d'un groupement carboxyle activé " 3

4-Stéréospécificité de la réaction

5-Dosage et purification de l'enzyme " 4

6-Glutamine synthétase de S. cerevisiae

B-BIOSYNTHESE DE LA PROLINE " 5

1-Chez E. coli

2-Chez les champignons " 7

C-BIOSYNTHESE DE L'ORNITHINE

1-Chez les bactéries

2-Chez les champignons " 9

D-INTERRELATIONS ENTRE LES VOIES METABOLIQUES DE L'ORNITHINE ET DE LA PROLINE- " 11

1-Cas des bactéries

2-Chez les champignons 12

II -MATERIEL ET METHODES

A-MISE EN CULTURE " 14

1-Milieux

2-Souches utilisées " 15

3-Contrôle des croissances

../..

B-ISOLEMENT DE MUTANTS page 16

1-Mutagénèse

2-Expression des mutations

3-Sélection des mutants

4-Isolement des mutants 17

5-Caractérisation

6-Optimisation de la méthode 18

C-OBTENTION D'UNE SOUCHE ISOGENIQUE DE SIGMA OTROSE-

1-Préculture

2-Mutagénèse

3-Hybridation

4-Isolement des spores 19

D-PREPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES ET DOSAGE DES PROTEINES- 20

1-Préparation des extraits enzymatiques

2-Filtration des extraits

3-Dosage des protéines

E-DOSAGE DU γ-GLUTAMYL PHOSPHATE : Mesure de l'activité des enzymes phosphorylant le glutamate 21

1-Formation du γ-glutamyl phosphate

2-Mise en évidence du γ-glutamyl phosphate et principe du dosage

3-Courbe d'étalonnage 22

4-Dosage du γ-glutamyl phosphate formé à partir de l'acide glutamique

5-Mesure de l'activité γ-glutamyltransférase 23

F-DOSAGE DE L'ACIDE Δ1-PYRROLINE-5-CARBOXYLIQUE : MESURE DE L'ACTIVITE ORNITHINE TRANSAMINASE 24

1-Mise en évidence du composé

2-Préparation du γ-glutamyl semialdéhyde 25

3-Courbe d'étalonnage

4-Dosage de l'ornithine transaminase 26

../..

III-RESULTATS EXPERIMENTAUX 28

A-COMPORTEMENT DE LA SOUCHE PROLINE⁻, COMPARE A CELUI DE LA SOUCHE SAUVAGE, VIS-A-VIS DES ACIDES AMINES DE LA FAMILLE DU GLUTAMATE

1-Inoculum récolté en phase exponentielle

2-Inoculum prélevé après 24 h. de privation azotée

3-Discussion

B-NATURE DE LA MUTATION : étude de l'activité de phosphorylation du glutamate 30

1-Recherche de la concentration optimum de proline pour la croissance du mutant sur milieu 2. 31

2-Evolution de l'activité de phosphorylation du glutamate au cours de la croissance

3-Etude comparée des activités de synthèse et de transfert de γ-glutamyl phosphate et de leur évolution pendant la croissance 32

4-Discussion

C-ESSAIS DE CONFIRMATION DE L'EXISTENCE D'UNE GLUTAMOKINASE SPECIFIQUE DE LA PROLINE, PAR DES METHODES ENZYMOLOGIQUES 35

1-Essai de rétroinhibition par la proline

2-Détermination de Km. 36

3-Essais de dénaturation thermique 37

4-Discussion 38

D-RECHERCHE D'UN MUTANT A DOUBLE DEFICIENCE (pro.ota)

1-Production d'un mutant ota.

2-Hybridations

3-Etude d'une souche issue du croisement pro.x ota: pro. 09.15 40

4-Dosage du γ-glutamyl phosphate 41

5-Cinétique de dénaturation thermique

6-Discussion 42

CONCLUSION 44

BIBLIOGRAPHIE